CLAUDIANE AYRES
(ORGANIZADORA)

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

Ano 2022

CLAUDIANE AYRES
(ORGANIZADORA)

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

Ano 2022

CIÊNCIAS
EXATAS E
DA TERRA E
ENGENHARIAS

Atena
Editora
Ano 2022

Collection: applied biomedical engineering

Diagramação: Bruno Oliveira
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Claudiane Ayres

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C697 Collection: applied biomedical engineering / Organizadora Claudiane Ayres. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-989-6
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.896220604

1. Biomedical engineering. I. Ayres, Claudiane (Organizadora). II. Título.

CDD 610.28

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

Considerada uma área de atuação do campo da saúde em grande expansão, capaz de atuar em várias modalidades (seja na avaliação, diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças, entre outras), visando sempre contribuir para melhora da qualidade de vida e saúde da população em geral, a área da **Engenharia Biomédica** vem se fundamentando cada vez mais como uma carreira profissional de grande valorização e importância para a sociedade, contribuindo nos avanços tecnológicos e melhorias na saúde de forma geral. Estimulados a compartilhar informações sobre as mais variadas formas de atuação dessa área com todos os interessados, a editora Atena lança o e-book "Collection: Applied biomedical engineering" (Coleção: Engenharia biomédica aplicada), que traz 4 artigos capazes de demonstrar parte da atuação inter e multidisciplinar que envolve a área da engenharia biomédica, e dessa forma, evidenciar algumas das contribuições dessa ciência que desenvolve abordagens inovadoras, capazes de intervir nas diferentes vertentes que envolvem a saúde e valorização da vida.

Convido- te a conhecer as diversas possibilidades que envolvem essa área tão inovadora e abrangente.

Aproveite a leitura!

Claudiane Ayres

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS SOBRE A TÉCNICA CRISPR/CAS9 - UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS

Data de aceite: 01/04/2022

Brenno Willians Hertel de Sousa
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/6850574524150132

Lustarllone Bento de Oliveira
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/8523196791970508

Pedro Henrique Veloso Chaves
Faculdade LS – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/7111417304584305

Felipe Monteiro Lima
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga Sul, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/1716595016675287

Grasiely Santos Silva
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Asa Norte, Brasília, DF.
http://lattes.cnpq.br/7162473361438597

Ikaro Alves de Andrade
Universidade de Brasília – Darci Ribeiro, Brasília, DF.
http://lattes.cnpq.br/9506665216259271

José Vanderli da Silva
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/9684793696420465

Nara Rubia Souza
Faculdade LS/Escola Técnica, Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/5393031755510188

Bruno Henrique Dias Gomes
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/1433679199177049

Joselita Brandão de Sant’Anna
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/7307926945059462

Marcela Gomes Rola
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/5551200316101130

Krain Santos de Melo
Centro Universitário do Distrito Federal – Unidade Brasília, Brasília, DF.
http://lattes.cnpq.br/6309826248449032

Raphael da Silva Affonso
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga, Taguatinga, DF.
http://lattes.cnpq.br/4169630189569014

RESUMO: Com a evolução das técnicas de edição gênica, a ferramenta CRISPR/Cas9 tem ganhado grande destaque nos últimos anos, demostrando-se como um sistema de fácil manipulação e com o potencial promissor de ser utilizado futuramente como um instrumento no tratamento de diversas doenças. Fundamentado nisso, a técnica CRISPR/Cas9 surgiu a partir da

observação de determinados lócus genômicos em microrganismos. Com isso, descobriu-se que o sistema CRISPR era um complexo de defesa responsável pela clivagem de material genético de organismos invasores, diferenciando-se pela utilização de segmentos de RNA que serviam como direcionadores das nucleases responsáveis pela clivagem, constituindo assim um sistema com grande especificidade. Baseado nesse complexo, surgiu a técnica CRISPR/Cas9, que utiliza uma endonuclease associada à um RNA guia para a realização de cortes em matérias genéticos de interesse, proporcionando a possibilidade de modificação genéticas controladas. Resultando assim, em uma ascensão de novas possibilidades de edições gênicas, sendo possivelmente uma excelente ferramenta para o tratamento de diversas patologias, apresentando resultados promissores. Além disso, devido a possibilidade de edição de material genético em embriões, a técnica CRISPR, tem sido contestada sobre os limites de aplicação que devem ser estabelecidos para esta ferramenta, gerando diversas discussões éticas. Portanto, apesar da capacidade promissora da ferramenta CRISPR/Cas9, os seus mecanismos de atuação ainda não são totalmente compreendidos, causando em diversos casos modificações genéticas em locais não planejados. Evidenciando assim, a necessidade de mais estudos nessa área, sendo uma ferramenta que talvez revolucione as formas de tratamentos utilizados pela medicina tradicional.
PALAVRAS-CHAVE: Crispr/cas9. Crispr/cas9 e patologias. Crispr e ética. Edição gênica.

GENERAL ASPECTS ABOUT THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE - USE IN THE TREATMENT OF PATHOLOGIES

ABSTRACT: With the evolution of gene editing techniques, the CRISPR/Cas9 tool has gained great prominence in recent years, proving to be an easy-to-handle system with promising potential to be used in the future as an instrument in the treatment of various diseases. Based on this, the CRISPR/Cas9 technique emerged from the observation of certain genomic loci in microorganisms.With that, it was discovered that the CRISPR system was a defense complex responsible for the cleavage of genetic material from invading organisms, differentiating itself by the use of RNA segments that served as directors of the nucleases responsible for the cleavage, thus constituting a system with great specificity. Based on this complex, the CRISPR/Cas9 technique emerged, which uses an endonuclease associated with a guide RNA to perform cuts in genetic material of interest, providing the possibility of controlled genetic modification. Thus resulting in a rise of new possibilities for gene editing, possibly being an excellent tool for the treatment of various pathologies, showing promising results. In addition, due to the possibility of editing genetic material in embryos, the CRISPR technique has been contested about the application limits that must be established for this tool, generating several ethical discussions. Therefore, despite the promising capability of the CRISPR/Cas9 tool, its mechanisms of action are still not fully understood, causing in many cases genetic modifications in unplanned locations. Thus, demonstrating the need for more studies in this area, being a tool that may revolutionize the forms of treatment used by traditional medicine.
KEYWORDS: Crispr/cas9. Crispr/cas9 and pathologies. Crisp and ethics. Gene editing.

1 | INTRODUÇÃO

O sistema CRISPR/Cas9 foi descoberto como um mecanismo de defesa pertencente à alguns grupos de bactérias. Descobriu-se que endonucleases específicas, denominadas de Cas9, atuavam na clivagem de material genético invasor, transformando-os em fragmentos de pequenas sequências de nucleotídeos que posteriormente eram inseridos em determinados sítios do próprio genoma bacteriano, esses locais foram designados como *locus* CRISPR. Baseado nesse sistema, foi possível realizar adaptações para que essa mecânica fosse aplicada em outros organismos. Com isso, desenvolveu-se a técnica CRISPR/Cas9, que consiste na utilização de um RNA guia, que atuará no direcionamento até a sequência de DNA alvo, e uma nucleasse (Cas9), que ao se combinarem formam um complexo com capacidade de clivar filamentos de material genético específico, permitindo a inserção ou deleção de genes de interesse, facilitando assim, modificações genéticas em determinados sítios alvos. Fundamentado nisso, a técnica CRISPR/Cas9 tem sido nos últimos anos a tecnologia de maior importância no âmbito da edição gênica, sendo um dos recursos mais explorados dentro das terapias gênicas, demostrando-se como uma ferramenta promissora e com grande capacidade de ser utilizada no tratamento de variadas patologias. Assim, podemos inferir o seguinte questionamento: quais são as noções básicas sobre a técnica CRISPR/Cas9 e em quais tratamentos sua tecnologia tem o potencial de ser aplicada? Afinal, é imprescindível uma abordagem que explore a complexidade de uma tecnologia tão nova e passível de investimentos. Possibilitando uma visão inovadora sobre o potencial que a técnica apresenta sobre os tratamentos convencionais, mostrando que é possível novas abordagens terapêuticas em doenças que desafiam a ciência.

2 | FUNDAMENTOS GERAIS SOBRE O SISTEMA CRISPR/CAS9

CRISPR sigla do inglês para *Clustered Regurlarly interspaced Short Palindromic Reapeats,* pode ser traduzida como: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (BARBOSA; CAVALCANTE, 2019). É um sistema que foi identificado inicialmente em organismos procariotos, sendo caracterizado por apresentar uma organização inédita em determinados lócus do genoma desses microrganismos. O padrão de conformação encontrado destacava-se por conter pequenas sequências de nucleotídeos que se ordenavam na forma de palíndromos, sendo regularmente intercaladas por certos segmentos singulares de nucleotídeos (DIAS; DIAS, 2018; GONÇALVES; PAIVA, 2017). Dessa maneira, pesquisadores conseguiram determinar que as sequências singulares que intercalavam os arranjos palindrômicos eram de procedência extracromossômica, sendo derivadas de segmentos de material genético invasor, esses segmentos possibilitariam uma espécie de memória em relação a invasões anteriores (EMBRAPA, 2020), sendo estabelecido que esse sistema servia como um mecanismo de defesa de bactérias e Arqueas contra elementos genéticos com capacidade invasiva (JINEK *et al.,* 2014). Desse modo, entendeu-se que através de alguns processos de clivagem, pequenos segmentos do

material genético do invasor eram integrados no genoma das próprias bactérias e Arqueas, sendo os fragmentos exógenos incorporados entre sequências curtas de nucleotídeos de conformação palindrômica e que sempre repetiam-se, fomentando na estruturação geral do lócus CRISPR. Assim, ao serem inseridos no genoma, os fragmentos exógenos passam a ser denominados de espaçadores (ALVES, 2019; JINEK et al., 2012). À vista disso, mediante necessidade, o lócus CRISPR pode passar por processos de transcrição, transformando-se em uma sequência de RNA direcionadora encarregada pelo reconhecimento de alvos genômicos através do pareamento de bases nitrogenadas, que em associação com as proteínas Cas (*CRISPR associated proteins),* forma-se um complexo responsável pela clivagem e degradação de material genético invasor (VIEIRA *et al.*, 2016). Fundamentado nisso, é elucidado por Jiang e Marraffini (2015) que existem três tipos de sistema CRISPR-Cas utilizados como sistema de defesa dos organismos procariontes, sendo que cada um é agrupado de acordo com características de conservação dos genes Cas e da organização dos promotores de transcrição. Com base nisso, a partir do sistema de defesa CRISPR-Cas do tipo II, que é caracterizado pela participação da endonuclease Cas9 associada à um RNA guia, foi possível realizar adaptações que permitiram a aplicação em outros organismos vivos, tendo como consequência o desenvolvimento da técnica CRISPR/Ca9, que tem sido explorada para a edição e manipulação gênica (SANTOS *et al.*, 2016; JIANG; MARRAFINI, 2015).

Desse modo, o sistema CRISPR/Cas9 do *Streptpcoccus pyogenes*, foi o primeiro sistema modificado para a realização de edições genômicas em organismos eucariotos. Assim, o complexo CRISPR/Cas9 em sua totalidade divide-se em três etapas gerais (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015; BALBINO *et al.,* 2016): A primeira etapa, denominada de adaptação, é marcada pela integração de um novo espaçador ao lócus CRISPR, ocorrendo mediante a um primeiro contato do organismo hospedeiro contra elementos genéticos móveis, como bacteriófagos e plasmídeos. Assim, ao ser reconhecido, o DNA exógeno promove a ativação do complexo proteico Cas, resultando em uma clivagem do material genético invasor em segmentos com 20-40 pares de bases, essas sequências de nucleotídeos são incorporadas como novos espaçadores no lócus CRISPR. Em consequência disso, as bactérias ou Arqueas adquirem imunidade, possibilitando uma resposta mais dinâmica contra invasões futuras do mesmo patógeno (ALVES, 2019; CAETANO *et al.,* 2018). A segunda etapa, denominada de expressão ou biogênese do crRNA, tem como princípio a formação de crRNAs (*CRISPR derived RNA*) maduros, que são porções de RNA derivados do lócus CRISPR que reconhecem o DNA-alvo. Essa etapa começa com a transcrição inicial do lócus CRISPR em uma longa fita precursora de RNA, sendo necessário a maturação dessa fita através da associação com uma molécula denominada de RNA transativador (tracrRNA), resultando em uma molécula de RNA de cadeia dupla. Com a formação do duplex de RNA, ativa-se o recrutamento de uma enzima específica, que atuará na maturação final da fita, formando um híbrido crRNA-tracrRNA,

que assumirá a função de um RNA guia (gRNA). (RAMOS, 2016; VIEIRA et al., 2016). A terceira etapa, denominada de interferência, é caracterizada pela ação efetiva contra o DNA invasor. Assim, a partir do duplex de crRNA-tracrRNA, tem-se a associação com a endonuclease Cas9, formando um complexo de ribonucleoproteína que efetivamente atuará no reconhecimento e clivagem do DNA exógeno, onde o gRNA será responsável pelo direcionamento da nuclease até o sítio apropriado, ocorrendo o pareamento de bases específicas (MAKAROVA *et al.,* 2011; BALBINO *et al*., 2016). Como consequência disso, visando um aprimoramento de todo o processo, cientistas sofisticaram o híbrido crRNA-tracrRNA para uma molécula única quimérica, sendo designada como RNA-guia único (sgRNA) (SYNTHEGO, 2021). Com isso, a aplicação da técnica CRISPR tornou-se mais abrangente, sendo possível projetar teoricamente sgRNA para qualquer sequência específica de interesse. Assim, a utilização de sgRNA resultou em um processo mais dinâmico para a técnica CRISPR/CAS9. Dessa forma, com o direcionamento do sgRNA, a endonuclease Cas9, será a enzima que atuará efetivamente na quebra da fita dupla de DNA (JINEK *et* al., 2014; GONÇALVES; PAIVA, 2017). A enzima cas9 possui dois sítios ativos que desempenham atividades catalíticas, o domínio HNH, que é responsável pela clivagem da fita complementar, ou seja, a fita no qual o RNA guia realiza a complementariedade de bases nitrogenadas com o DNA alvo, e o domínio RuvC, que atua clivando a cadeia não complementar (CAETANO *et al.,* 2018). Para que esse processo ocorra, é necessário a presença de uma sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) no DNA alvo. As PAMs são pequenas sequências de nucleotídeos que ficam localizadas em uma região adjacente ao início da sequência alvo, ou seja, estão presentes no DNA alvo, sendo essências para fixação da nucleasse Cas9 ao sítio alvo (EMBRAPA, 2020). Dessa forma, através da identificação das sequências PAMs, torna-se possível realizar a abertura da dupla fita do DNA alvo, com interação do RNA guia e subsequente clivagem pelos domínios catalíticos da Cas9. Sem a presença de PAMS, não há reconhecimento pela Cas9, mesmo que o sgRNA seja complementar ao sítio alvo (BARBOSA; CAVALCANTE, 2019). Um outro ponto de importância dos motivos PAMs é sua relação com os efeitos *off-target*. No qual, descobriu-se que determinadas sequências PAMs podem ser responsáveis por um reconhecimento imprevisível pela nuclease Cas9, gerando clivagens fora do sítio alvo, independentemente da complementariedade de bases do RNA guia (SYNTHEGO, 2021; VIEIRA *et al.,* 2016). Todo esse processo pode acarretar problemas para execução da técnica CRISPR. Com base nisso, outras versões da Cas9 têm sido utilizadas pela técnica CRISPR/Cas9 visando diferentes possibilidades. As *nickases* são nucleases Cas9 que possuem apenas um domínio catalítico ativo, ou seja, através da inativação de um dos domínios catalíticos RuvC ou HNH, a Cas9 passa a realizar apenas um corte em uma das cadeias do DNA-alvo, possibilitando alterações mais específicas nos nucleotídeos. Outra variante da Cas9 são as denominadas *dead Cas9 (dCas9)*, no qual ambos os sítios catalíticos são inativados, resultando em uma endonuclease Cas9 com capacidade catalítica morta, sendo explorada

como mecanismo para regulagem de genes, sem a fragmentação do material genético. (RAMOS, 2016; EMBRAPA, 2020). Assim sendo, as aplicações do sistema CRISPR/Cas9 tem proporcionado sua exploração nos mais variados campos de estudos, com grande destaque para o seu iminente aproveitamento no tratamento de doenças, demostrando-se como uma ferramenta com grande potencial (CAETANO *et al.,* 2018).

3 I TÉCNICA CRISPR/CAS9 E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

A principal utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido com o propósito de aplicação nos processos de edições gênicas, tendo como destaque atual a sua facilidade em ser ajustada e empregada em diferentes linhagens celulares e em variados organismos. Com isso, como uma alternativa aos tratamentos convencionais, a técnica CRISPR/Cas9 passou a ser testada como uma ferramenta promissora dentro das pesquisas com terapia gênica em humanos. Assim, as principais abordagens dentro das edições genômicas, referem-se aos processos básicos de introdução, substituição ou deleção de genes alvos, resultando em possibilidades de induzir a expressão ou supressão de genes, além das chances de reparar mutações genéticas (BARBOZA *et al.,* 2019). Dessa maneira, a circunstância de maior exploração da técnica CRISPR/Cas9 para se alcançar as alterações das sequências gênicas tem sido a partir das extremidades formadas após o duplo corte das cadeias de DNA (DSB), realizadas pelas Cas9. Sendo que, após a separação das fitas, mecanismos de reparação celular são utilizados para que as modificações nos genes alvos sejam efetivamente concretizadas. Assim, existem duas principais vias de reparo celular quando há o DSB, sendo: União de extremidades não homólogas (NHEJ) e o Reparo direcionado por homologia (HDR) (VIEIRA et al., 2016).

O NHEJ é a via de reparo que ocorre com maior frequência nas células eucarióticas, consistindo essencialmente na ligação das extremidades do DNA após a DSB, reunindo as duas pontas de maneira direta, independente da homologia das duas extremidades das fitas. Apesar de reestabelecer o DNA, esse mecanismo apresenta maior possibilidade de gerar mutações. Assim, os processos de NHEJ, em conjunto com a Cas9, tem sido explorados para a indução de mutações controladas, ou deleção de pequenas sequências de nucleotídeos indesejadas, resultando em um "*knock-out*" (inativação) dos genes alvos. Ou seja, com o nocaute dos genes, não haverá a produção de proteínas que normalmente seriam reguladas pela expressão desses sítios. Permitindo assim, estudos sobre a atuação de diversos genes no organismo, e de suas consequências, através de sua anulação básica.

A segunda via de reparação após a quebra, o HDR, explora a capacidade de reestabelecer as fitas de DNA através da homologia entre as extremidades geradas durante o DSB, utilizando um DNA molde que servirá como doador, apresentando extremidades

homólogas com as da fita alvo clivada. Esse processo permite diversas modificações em genes alvos, como a incorporação de novas sequências de DNA no genoma, correção de genes não codificantes, e substituição de sequências nucleotídicas, possibilitando a correção de mutações, ou seja, reestabelecendo a função normal dos genes. Esses processos de introdução de novos segmentos de material genético no genoma são denominados de *knock-ins*. Dessa maneira, as vantagens de se utilizar os mecanismos de HDR é que a aplicação de DNA moldes tornam o processo mais preciso, diminuindo as chances de ocorrência de mutações. Em contrapartida, a eficiência dos mecanismos de HDR depende diretamente do tamanho do DNA doador, onde, à medida que as sequências moldes são amplificadas, diminui-se as chances de êxito do processo. Impactando assim, na correta introdução de genes funcionais ou do reestabelecimento das fitas clivadas. (VIEIRA *et al.,* 2016; SYNTHEGO, 2021). Assim, a técnica CRISPR/Cas9 tem sido testada como uma ferramenta com capacidade favorável no tratamento de diversas patologias. Por se tratar de uma tecnologia relativamente nova, e que constantemente é limitada devido a fatores bioéticos, as aplicações da técnica CRISPR tem sido em grande parte experimentada em modelos animais que simulem condições patológicas semelhantes com as da espécie humana, ou em culturas de células somáticas humanas, tendo o seu uso em células embrionárias delimitada de acordo com as legislações de cada país (GONÇALVES; PAIVA, 2017; MONTEIRO; SILVA, 2020).

Fundamentado nisso, alguns estudos vêm revelando resultados promissores quanto a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 no âmbito da cardiologia, explorando a possibilidade de supressão de genes associados diretamente com a incidência de doenças cardiovasculares. Referente a isso, pesquisas realizadas por Ding *et al*. (2014), demostraram êxito no silenciamento de genes PCSK9 através de mecanismos NHJE. Os genes PCSK9 são responsáveis por codificar a pró-proteína de nome homólogo, que atua diretamente na degradação de receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL), prejudicando sua remoção do plasma com subsequente acúmulo, podendo levar a hipercolesterolemia e consequente desenvolvimento da doença arterial coronariana. Os resultados da pesquisa, após o silenciamento dos genes, certificaram uma diminuição por volta de 40% dos níveis de colesterol dos modelos animais testados. Apresentando-se como um potencial alternativo para pacientes que necessitam de intervenção farmacológica para redução dos níveis de LDL, mas que são intolerantes ou resistentes às estatinas (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017, FERREIRA; FONSECA; MANGUEIRA, 2012).

Uma outra fonte de estudos da aplicabilidade do sistema CRISPR/Cas9 tem sido no tratamento das hemoglobinopatias (RAMOS, 2016). Esse grupo de patologias caracteriza-se por desordens na produção da hemoglobina, sendo causada por mutações nos genes responsáveis pela codificação das cadeias de globina (BATISTA *et al.,* 2020). Com isso, estudos iniciais realizados por Xie *et al.,* (2014) demostraram a possibilidade de correção de mutações do gene HBB, associadas diretamente com o desenvolvimento da Talassemia

beta. O experimento utilizou uma cultura de células-tronco pluripotente induzidas (IPSCs). Aplicando o sistema CRISPR/Cas9, os pesquisadores induziram a clivagem dos nucleotídeos contendo os gene HBB, e através de mecanismo de recombinação homóloga, obteve-se diferenteS IPSCs com mutações corrigidas. Além disso, as células corrigidas não foram acometidas de efeitos *off-target*, mantendo suas características de pluripotência. Assim, é sugerido pelos pesquisadores, que a partir das células IPSCs corrigidas do próprio paciente, torna-se possível diferencia-las em linhagens hematopoiéticas, facilitando os processos de transplante de medula óssea, reduzindo assim as chances de rejeição (XIE et al., 2014). Além disso, estudos mais recentes obtiveram resultados promissores na edição gênica pela técnica CRISPR/Cas9 utilizando seres humanos. A pesquisa utilizou dois pacientes, sendo um portador da Talassemia beta dependente de transfusão (TDT), e o outro portador da Anemia Falciforme (SCD). Levando em consideração a premissa que os indivíduos portadores TDT e SCD que possuem níveis de hemoglobina fetal persistentes até a fase adulta apresentam redução considerável, ou até mesmo não desenvolvem a doença. Com isso, pesquisadores utilizaram o complexo CRISPR/Cas9 para modificar o DNA de células tronco hematopoiéticas visando a redução da capacidade de expressão do gene BCL11A. Tal gene está associado com a supressão da expressão da hemoglobina fetal em eritrócitos. Dessa maneira, após a edição pela tecnologia CRISPR, a paciente portadora de TDT foi acompanhada pelo período de 18 meses, onde, sua hemoglobina fetal aumentou gradativamente de 0,3 g/dL para 13.1 g/dL ao longo do período. Além disso, as necessidades de transfusões sanguíneas diminuíram notadamente, passando de 34 bolsas de sangue por ano, para apenas uma, após o transplante. Já a paciente portadora da SDC apresentava quadros constantes de vaso-oclusão severa, além da necessidade de receber cerca de 5 transfusões sanguíneas por ano. Após aplicação do sistema CRISPR, a paciente foi acompanhada pelo período de 15 meses, demostrando um aumento dos níveis de hemoglobina de 7.2 g/dL para 12,0 g/dL. Além disso, os níveis de hemoglobina fetais aumentaram de 9.1% para 43,2%. A paciente não apresentou mais episódios de vaso oclusão durante o período de acompanhamento, nem a necessidade do recebimento de transfusões sanguíneas (FRANGOUL *et al.,* 2020).

Já em relação as patologias causadas por infecções virais, diferentes pesquisas têm buscado utilizar o sistema CRISPR/Cas9 como uma possibilidade de cura em um futuro promissor, assim, estudos realizados em modelos animais e em cultura de células humanas, demostraram resultados relevantes em infecções causados por vírus como o da Hepatite B, HIV, HPV e mononucleose. Sendo a maior parte dos esforços direcionados ao combate do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (ROSA; ROVERSI; FEITOSA, 2019). Como consequência disso, as atuais estratégias para inibição e eliminação do vírus do HIV através do complexo CRISPR/Cas9, concentram-se na inativação nos genes dos receptores CCR5 ou CXCR4, ou através da clivagem direta do DNA viral presente no genoma hospedeiro (conhecido como: pro-vírus). O raciocínio envolvendo a deleção

dos genes CCR5 relaciona-se com os mecanismos de fisiopatologia da infecção pelo HIV (SILVA; SILVA; VILELA, 2021). Dessa maneira, pesquisas iniciais aplicando o complexo CRISPR/Cas em células tronco IPSCs, obtiveram culturas celulares com os genes CCR5 silenciados. Após processos de diferenciação em macrófagos, as células passaram a apresentar resistência a infecção pelo vírus do HIV-1 em testes *in vitro*. Posteriormente, pesquisadores tiveram êxito em conseguir retirar totalmente o material genético do HIV-1 em culturas de linfócitos T CD4. A estratégia utilizada, empregou uma endonuclease Cas9, guiada por uma sgRNA, direcionada para áreas do genoma viral conhecidas como *Long Terminal* Repeats (LTR). A clivagem de tais regiões resultou em redução da carga viral e eliminação de vírus latente, além da resistência contra novas infecções (RAMOS, 2016; PASSOS *et al.,* 2016).

Um outro campo que tem sido explorado é da possível capacidade da técnica CRISPR-Cas9 na terapia dos mais variados tipos de cânceres. Por se tratar de uma doença envolvida diretamente com desordens genéticas, o câncer, tem sido alvo de estudos com a ferramenta CRISPR. Dessa maneira, pesquisas realizadas por Rosenblum *et al.* (2020) divulgaram resultados promissores na terapia dos cânceres de ovário metastático e cerebral (Glioblastoma), onde, modelos animais testados, obtiveram aumento em 80% das chances de sobrevivência ao câncer de ovário metastático. Já em relação ao Glioblastoma, considerado um dos cânceres com menor chance de sobrevivência, os testes conseguiram inibir as chances do crescimento tumoral em 50%, e aumento das chances de sobrevivência em 30%. Para isso, em relação ao tratamento do Glioblastoma, os pesquisadores utilizaram o sistema CRISPR-Cas9 direcionado contra o lócus PLK1, sendo conhecidos por sua alta expressividade em cânceres cerebrais. Com isso, a inibição do PLK1 possibilita o processo de apoptose pelas células tumorais, levando a uma limitação do crescimento tumoral. Já em relação ao câncer de ovário, os pesquisadores direcionaram o complexo CRISPR contra os genes EGFR, que estão diretamente relacionados com a recepção do fator de crescimento do meio extracelular, permitindo o crescimento e divisão celular. Esses genes estão associados com uma expressão desregulada em diversos cânceres. Assim, a inibição do EGFR concebeu resultados auspiciosos (ROSENBLUM *et al.,* 2020; WANG *et al*.,2020). Outros estudos promissores sobre a utilização da técnica CRISPR/Cas9 no tratamento de patologias e alterações gênicas são evidenciados em distúrbios como a Acondoplasia, Distrofia de Duche, Osteoartrite, Amaurosis conginital de Leber, Fibrose Cística, entre outras (BARBOZA *et al.,* 2019).

Além de sua aplicação direta no tratamento de patologias, o sistema CRISPR-Cas9 pode ser utilizado de outras maneiras, por exemplo, através da interferência em vetores transmissíveis de doenças, tal como , a utilização da técnica na alteração de genes que levam a esterilidade de fêmeas de mosquitos transmissores de doenças, essa realização permite um controle de reprodução desses mosquitos, o que consequentemente reflete nas taxas de transmissão de patógenos repassadas pelo vetor, permitindo a possibilidade

de controlar endemias e epidemias causadas por vírus ou parasitas presentes no mosquito (HAMMOND *et al*., 2016; ROSA; ROVERSI; FEITOSA, 2019). Devido aos diferentes campos de atuação do sistema CRISPR e das possibilidades de alteração gênica, inúmeros debates têm sido promovidos para discutir questões éticas e dos possíveis impactos que essa tecnologia pode gerar.

4 I CRISPR/CAS9 E OS SEUS ASPECTOS ÉTICOS

Em novembro de 2018, o cientista He Jiankui, entrou para história ao anunciar a realização da primeira edição gênica em embriões humanos que foram fertilizados *in vitro* e efetivamente implantados em um útero. Segundo He Jiankui, a edição proposital dos embriões resultou no nascimento de dois seres humanos resistentes ao HIV. No caso, as gêmeas apelidadas de Lulu e Nana, tiveram seu material genético embrionário editados pela técnica CRISPR/Cas9. He Jiankui, informou ter realizado mutações nos genes CCR5 nos cromossomos dos embriões, tornando-as supostamente resistentes à infecção pelo HIV. Apesar de abrir esperanças para a utilização da técnica no tratamento de diversas doenças, a repercussão do anúncio do biofísico He, resultou em uma ascensão dos debates acerca dos limites éticos da utilização de ferramentas de edição gênica. Além disso, o cientista, não submeteu os seus resultados para avaliações por outros pesquisadores, e para publicação em revistas científicas, gerando suspeitas sobre a veracidade de seu procedimento, ou em caso de autenticidade do processo, questiona-se sobre os efeitos da deleção do gene CCR5 e de possíveis alterações fora do alvo, ocasionado debilidades à saúde das gêmeas.

Nesse contexto, a técnica CRISPR/Cas9 por ser a ferramenta com maior capacidade de evolução referente à modificação de genes nos mais variados organismos, tornou-se o principal alvo de discussões éticas e bioéticas, gerando inquietações sobre os limites de aplicabilidade da técnica como ferramenta de edição genômica, afinal, além dos aspectos técnicos do sistema CRISPR/Cas9, é importante entender os seus impactos em âmbitos sociais, políticos, ecológicos e econômicos. (GREELY, 2019; SPIRA, 2019; PESQUISA FAPESP, 2018). Com isso, apesar de diversos resultados promissores, é necessário um melhor entendimento sobre todas as variações que a tecnologia CRISPR pode exercer sobre os genes. A primeira indagação sobre a ampla utilização do complexo CRISPR em edições gênicas refere-se aos possíveis efeitos “fora do alvo” gerados pelo processo. Tais eventos, resultam em uma dificuldade de controlar totalmente a especificidade da técnica, interferindo na realização de uma modificação gênica precisa. Os efeitos *off target* ainda não são inteiramente compreendidos, sabe-se que a complementariedade da bases realizadas entre o RNA guia e o alvo, não são os únicos fatores que irão determinar a especificidade de clivagem pela Cas9, condições como: estado da cromatina, estruturação do RNA guia e os mecanismos de reparação celular, são requisitos que influenciam diretamente na

precisão da edição. Desse modo, alguns grupos, argumentam que os genes possuem múltiplas funções, e que determinadas alterações não planejadas, poderiam causar danos irreversíveis ao organismo editado, existindo a possibilidade de que as mutações geradas sejam perpetuadas no genoma, sendo eventualmente transmitidas para as próximas gerações. Para que tal evento aconteça, as células alteradas, devem ser de linhagem germinativa (GONÇALVES; PAIVA, 2017; RAMOS, 2016).

Baseado nisso, alguns grupos de cientistas defendem que a edição genética em células germinativas são eticamente inaceitáveis, e intercedem a favor do desencorajamento de alterações em linhagens germinativas humanas, e ainda, argumentam que mutações indesejadas prejudicariam o patrimônio genético da espécie humana (FURTADO,2019; FURTADO,2020). Com isso, grande parte dos indivíduos que são contra a edição de células germinativas, exigem uma moratória sobre os experimentos com esses grupos celulares, ou seja, um pedido para que todas as nações não autorize as aplicações de ferramentas de edição em linhagens germinativas por alguns anos, requisitando novas discussões éticas e bioéticas durante esse período de tempo. Sendo também alegado, que em uma outra perspectiva, as técnicas de edição gênica poderiam resultar em injustiças e desigualdades sociais, despertando atitudes discriminativas, como a repressão de indivíduos com algum tipo de deficiência física, no qual, à medida que ocorrer a normalização das alterações gênicas, seria possível que indivíduos portadores de necessidades especiais sejam menos valorizados em uma escala social, prevalecendo uma relação de exclusão. Em contraponto, outros pesquisadores, alegam que a edição de células de linha germinativas seriam a solução para diversos distúrbios genéticos que causam sofrimento em milhares de indivíduos, apresentando grande potencial terapêutico. Além disso, determinadas críticas afirmam a necessidade de estudos de edição em embriões, sendo colocadas como extremamente necessárias, e que se abdicar do envolvimento em investigações que protegem a vida é ser moralmente culpado por mortes previsíveis e evitáveis. Sugerindo então, que em oposição à implementação de moratórias, a elaboração de regulações seriam procederes mais convenientes, possibilitando e garantindo um uso seguro de intervenções promissoras à saúde e o bem estar da população. Desse modo, levando em consideração as hesitações sobre a utilização da técnica CRISPR, é possível indagar, que o progresso da medicina muitas vezes não é acompanhada de uma precisão imediata, evoluindo e se aperfeiçoando com o decorrer dos anos. Dessa maneira, apesar dos debates e das contradições da utilização da técnica CRISPR/Cas9 em linhagens germinativas, boa parte dos pesquisadores demonstram-se flexíveis quanto a aplicação da técnica em células somáticas, ou seja, em células totalmente diferenciadas, desde que destinadas a fins terapêuticos (FURTADO, 2019; BELO; PAIVA; FILHO, 2020; SGANZERLA; PESSINI, 2020; FURTADO, 2020).

Já em uma outra perspectiva, caso as aplicações do sistema CRISPR/Cas9 sejam totalmente viáveis, e os pesquisadores tenham domínio absoluto sobre a tecnologia,

uma outra questão que causa apreensão da comunidade cientifica é em relação a possibilidade dos impactos sociais futuros pertinentes a técnica, onde, a modificação de genes, poderia acarretar em uma seletividade de um padrão genômico, com propensão ao risco do surgimento de uma nova eugenia ou eugenia liberal, viabilizando a decisão de escolhas de características de maneira artificial, possibilitando a preferência por fenótipos específicos considerados como “ exemplo”, além das chances de se tornar aceitável a instrumentalização da vida humana, como os “bebês projetados”, sendo produzidos e moldados de acordo com as preferências dos pais. Além do mais, como toda tecnologia, é possível que as aplicações da ferramenta CRISPR prevaleça sobre as populações mais ricas, imortalizando uma sociedade desigual, com indivíduos indubitavelmente privilegiado pelas modificações genéticas (HUPFFER; BERWING, 2020; PANETTO; ZAGANELLI; OLIVEIRA, 2020).

Além das questões éticas envolvendo a manipulação de células humanas, outras questões que envolvem o sistema CRISPR/Cas9 referem-se aos seus impactos ambientas, sejam positivas ou negativas. No qual, a modificação genética de determinados organismos, poderia causar alterações em espécies inteiras. Como exemplo atual dessa aplicação, tem-se a utilização de ferramenta de edição gênica para modificação de vetores transmissores da Malária, sendo um problema endêmico em diversas regiões. Desse modo, a esterilização do vetor, poderia reduzir consideravelmente os índices de contaminação. Além de linhas de pesquisas que argumentam que a edição gênica poderia ser utilizada para a conservação de espécies em risco. Porém, em contrapartida, argumenta-se que as edições artificiais em populações poderiam impactar a biodiversidade e os ecossistemas de maneira irreversível (NEVES; DRUML, 2017; DINIZ *et al.,*2016).

Dessa maneira, evidencia-se a importância da prudência dos pesquisadores na conduta de experimentos que envolvam alterações no genoma, independente da espécie. Ainda que rodeada de contrariedades, a técnica CRISPR-Cas9 demostra-se como uma alternativa esperançosa para indivíduos portadores de doenças genéticas. Sendo uma tecnologia que dependendo de seu contexto, pode trazer uma gama de benefícios ou de efeitos nocivos para a sociedade, abrindo oportunidade para diferentes perspectivas éticas de sua aplicação (GOLÇALVES; PAIVA, 2017).

5 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica CRISPR utiliza uma endonuclease para a clivagem de material genético, sendo o grande diferencial dessa ferramenta a utilização de um RNA previamente sintetizado que servirá como um guia para a endonuclease, definindo os pontos exatos de clivagem, onde, a complementariedade de bases nitrogenadas entre o RNA guia e o material genético alvo, proporciona uma especificidade e facilidade de modificação do DNA como nunca antes visto. Tornando a técnica CRISPR/Cas9 como uma das ferramentas

mais revolucionárias dentro do âmbito da edição gênica.

A técnica CRISPR tem sido testada principalmente no campo da terapia gênica, onde, após a clivagem da dupla fita de DNA, mecanismos de reparo celular tem sido explorados para modificação de sequências de nucleotídeos, possibilitando a introdução, exclusão, ativação ou silenciamento de determinados genes. Com isso, a ferramenta CRISPR/Cas9 passou a ser uma fonte de expectativas para patologias que possuem como causa principal alterações gênicas, demostrando-se como uma tecnologia que futuramente tenha a capacidade de ser aplicada como um método efetivo de cura para inúmeras doenças. Devido a simplicidade do complexo CRISPR/Cas9 a sua utilização passou a ser empregada em todo o mundo, onde, de acordo com as leis de cada país, os limites de aplicabilidade da técnica diferenciam-se, gerando apreensões entre as pessoas sobre as consequências que a utilização descontrolada da técnica podem provocar dentro da sociedade. Em razão das modificações do DNA proporcionadas pela ferramenta CRISPR/Cas, as preocupações acerca de sua utilização em linhagens germinativas são a fonte dos principais debates do limiar de aplicação da técnica CRISPR/Cas9, sendo apontado por alguns, como uma eminente possibilidade de surgimento de novas eugenias em um futuro não tão distante. Já outros indivíduos, acreditam que a edição em linhas germinativas talvez seja a melhor forma de erradicar distúrbios e doenças que afetam a humanidade.

Portanto, apesar da capacidade promissora da ferramenta CRISPR/Cas9, os seus mecanismos de atuação ainda não são totalmente compreendidos, existindo a chance de ocorrência de clivagens de outros segmentos de nucleotídeos fora do material genético alvo, resultando em alterações não planejadas, limitando assim as aplicações atuais da técnica CRISPR/Cas9 em seres humanos. Porém, é evidente a necessidade de mais investimento e estudos acerca do complexo CRISPR/Cas9, além da análise dos possíveis impactos que a utilização da técnica CRISPR/Cas podem acarretar, sendo uma ferramenta que talvez revolucione as formas de tratamentos utilizados pela medicina tradicional, proporcionando uma chance de cura para alterações que afetam negativamente a humanidade, libertando milhares de indivíduos de uma vida de sofrimento.

REFERÊNCIAS

ALVES, Hirisleide Bezerra. **Investigação estrutural e epidemiológica do sistema CRISPR/Cas em genomas de isolados clínicos de *Acionetobacter baumannii*.** 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

AREND, Marcela Corso, PEREIRA, Jessica Olivaes, MARKOSKI, Melissa Medeiro. O sistema CRISPR/CAS9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. vol.108. n.1. pp. 81-83. Ano. 2017.

BALBINO, Tereza Cristina Leal, BARROS, Maria Paloma Silva de, OLIVEIRA, Arthur Casulli de, PINHAL, Danillo, GARCIA, Bruno Henrique, PEREIRA, Tiago Campos. Capítulo 1, Introdução. *In*: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Cubo, 2016**.** pp. 29-38.

BARBOSA, Kledson Lopes, CAVALCANTE, Glensimon Souza Silva. A biotecnologia envolvida no sistema CRISPR, **Revista de Ciência médicas e biológicas,** Salvador, vol.18, n.1. pp. 123-127. Janeiro/abril.2019.

BARBOZA, Caroline Mota Souza, TERRA, Marcella Martins, RIBEIRO, Maria Luísa Candido, SILVA, Jacksiane Brandão. A técnica de CRISPR/Cas9 na terapia gênica: uma revisão da literatura. **Revista Transformar,** vol.13. n.1. pp. 652-671. Ano. 2019.

BATISTA, Gabriela SILVA, SANTOS, Nayhan Andrade, MARQUETI, Váleria Bastos, MOTA, Wesley Blanco, SILVÉRIO, Alessandra dos Santos Danziger. Hemoglobinopatias: investigação em sangue periférico de acadêmicos de uma universidade de Alfenas-MG. **Revista de Medicina,** Vol.99.n.03. pp.246-250. Ano.2020.

BELO, Thiago Caetano Andrade, PAIVA, Priscila Henrique Moraes, FILHO, Nelson Delú-. A aplicação da técnica de edição de genomas CRISPR-CAS9 na engenharia genética: benefícios à ciência e sociedade e impasses éticos frente ao desconhecido, em especial na edição embrionária humana. Centro Universitário do Sul de Minas. 2020.

CAETANO,Gisdenilton Carlos Gonzaga, MATOS, Higor de Oliveira Santos, SIMÃO, Caroline Ramos, Rayanne Vindilino Duarte, BARRETO, Sabrina Antunes, HENRIQUE, Ivan Sales. Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial. **Brazilian jornal of surgery and clinical research**. vol. 25. n.2. pp. 96-99. 2019.

DIAS,Camila Almeida de Paula, DIAS, Janice Maria Ribeiro. Sistema CRISPR/CAS como uma nova ferramenta biotecnológica na edição de genomas: aplicações e implicações. **Revista ambiente acadêmico.** vol.4. n.1. pp.07-22. 2018.

DINIZ, Nilza Maria, CARNEIRO, Andréa Almeida, CARNEIRO, Newton Portilho, FRANÇA, Camila Tenorio, OLIVEIRA, Maria Betânia Melo, GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel. Capítulo 11- Questões éticas, legais, ambientais e de pioneirismo. *In*: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Cubo, 2016. Pág. 215-236.

DING, Qiurong, STRONG, Alanna, PATEL, Kevin M. NG, Sze-Ling GOSIS, Bridget S REGAN, Stephanie N, RADER, Daniel J, MUSURUNU, Kiran. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. **Circulation Reserach**.Vol.115. n.5. pp.488-492. Ano. 2014. DOUDNA LAB. CRISPR System. 2021.

EMBRAPA. **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas**. Brasília, DF. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2020. Pág. 210.

FERREIRA, Carlos Eduardo dos Santos, FONSECA, Francisco Antônio Helfenstein, MANGUEIRA, Cristóvão Luís Pitangueira. A PCSK9 e sua relevância clínica com os novos alvos terapêuticos contra dislipidemia. **Hospital Israelita Albert Einstein.** Vol. 10. n.04. pág. 526-527.Ano.2012

FURTADO, Rafael Nogueira. Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. **Revista Bioética.**Vol.24.N.02.pág.223-233. Brasília,2019.

FURTADO, Rafael Nogueira. Fundamentos ontológicos do debate sobre seleção e edição do genoma. **Revista de Psicologia.**Vol.32.N.02.p.111-119. 2020.

FRANGOUL, H. *et al.* CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and B-Thalassemia. **The New England Journal of medicine**. 2020

GREELY, Henry T. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. **Journal of Law and the Biosciences.** Vol.6.n.01. pág.111-183. Ano.2019.

GONÇALVES,Giulliana Augusta Rangel, PAIVA,Raquel de Melo Alves.Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Hospital Israelita Albert Einstein**. Vol. 15. n .3. pp.369-375.

HUPFFER, Haide Maria, BERWING, Juliane Altmann. A tecnologia CRISPR/CAS9: da sua compreensão aos desafios éticos, jurídicos e de governança. **Revista Pensar.** N.25. Pág.1-16. Ano. 2020

JIANG, Wenyan, MARRAFFINI,Luciano. CRISPR-CAS:New tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. **Annual review of microbiology.** Vol.69. p.209-228. Ano.2015.

JINEK, Martin, CHYLINSKI, Krzysztof, FONFARA, Ines, HAUER, Michael, DOUDNA, Jennifer A., CHARPETIER, Emmanuelle. A programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**. Vol. 337. Ano.2012.

JINEK, Martin, JIANG, Fuguo, TAYLOR, David W., STERNBERG, Samuel H, KAYA, Emine, MA, Enbo, ANDERS, Carolin, HAUER, Michael, ZHOU, Kaihong, LIN,

Steven, KAPLAN, Matias, LAVARONE, Anthony T., CHARPENTIER, Emmanuelle, NOGALES, Eva, DOUDNA, Jennifer A. Structure of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. **Science**. Vol. 343.Ano.2014.

MAKAROVA, Kira S, ARAVIND L, WOLF, Yuri, KOONIN, Eugene. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems**. Biol Direct**. Vol. 06. n.38. Ano.2011.

MONTEIRO, Lyni Cóe, SILVA, Marcos Vicente da. Limites da Pesquisa genética com Células-Tronco Embrionárias frente aos direitos à vida e à saúde. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento.** Ano 05, Ed. 11, Vol.23, pp. 117-136. Ano. 2020.

NEVES, Maria Patrão, DRUML, Christiane. Ethical implications of fighting malária with CRISPR/Cas9. **BMJ global health.** 2017.

PANETO, Greiciane Gaburro, ZAGANELLI, Margareth Vetis, OLIVEIRA Mateus

Miguel. Edição genética: as implicações na sociedade contemporânea da técnica *Clustered Regurlarly Interespaced Short Palindromic Repeat(*CRISPR-CAS9) - Uma análise ética, jurídica e social. **Derecho y Cambio social.** N°.61. Ano. 2020.

PASSOS, Geraldo Aleixo, HERNANDEZ, Cesar Augusto Speck, SOUSA, Larissa Cotrim, FELÍCIO, Rafaela de Freitas Martins, SOUZA, Tiago Alves Jorge. Capítulo 4, Aplicações da Técnica. *In*: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR, Ribeirão Preto, 2016.** Cubo, 2016. Pág. 71-95.

PESQUISA FAPESP: Chinês é suspenso por ter criado bebês com gene alterado. **Revista pesquisa Fapesp.** Edição. 274. Dezembro. 2018. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/chines-e-suspenso-por-ter-criado-bebes-com-genealterado/. Acesso em: 01/11/2021.

RAMOS, António David Rufino. **CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. Trabalho monográfico (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

ROSA, Jonas Ribeiro, ROVERSI, Fernanda Marconi, FEITOSA, Lucas de Souza Ramalhaes. Capitulo 11, Edição Genética Através do CRISPR para Tratamento de Doenças.In: FREITAS, Renata Mendes de (org.). **Ciências Biológicas Campo Promissor em Pesquisa.** Ponta Grossa-PR. Atena Editora, 2019. Pág.98-116.

ROSENBLUM, Daniel, GUTKIN, Anna, KEDMI, Ranit, RAMISHETTI, Srinivas VEIGA, Nuphar, JACOBI Ashley M, SCHUBERT, Mollie S, FRIEDMANN-MORVINSKI, Dinorah, COHEN, Zvi R, BEHLKE, Mark A, LIEBERMAN, Judy, PEER, Dan. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. **Science advances**.Vol.6.n.47. Ano.2020.

SANTOS, Sadna Larissa Freitas dos, ALVES, Hérick Hébert da Silva, PRADO, Regilane Matos da Silva, BARROS, Karla Bruna Nogueira Torres. CRISPR: uma nova era na biologia molecular, **Revista Biotecnologia e Ciência**.Vol.05. n.2. pp.4048, 2016.

SILVA, Lúcia Helena Martins, SILVA, Nathalia Félix, VILELA, Leonardo de Figueiredo.Aplicação da Tecnologia do Sistema CRISPR cas-9 no Tratamento do Vírus da Imunodeficiência Humana. **Revista Episteme Transversalis.**Vol.12. n.2, pág.289-317. Ano.2021

SPIRA, Beny. Edição genética em humanos: técnica e ética**. Revista Questão de ciência.** Publicado em 3 de janeiro de 2019. SYNTHEGO. CRISPR 101 your guide to understanding CRISPR. 2021. Disponível em: https://www.synthego.com/resources/crispr-101-ebook. Acesso em: 12/04/2021. VASCONCELOS, Maria José Vilaça de, FIGUEIREDO, José Edson Fontes. **Tecnologia CRISPR-Cas para a edição genômica.** Sete Lagoas, MG. Publicado por Embrapa Milho e Sorgo, 2015-. ISSN 1518-4277.

VIEIRA, Gabriel Viliod, CECÍLIO, Nerry Tatiana, ARRUDA, Letícia Magalhães, SALES, Katiuchia Uzzun. Capítulo 2, Visão geral do mecanismo básico de ação. *In*: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR, Ribeirão Preto, 2016.** Cubo, 2016. pp.39-49

XIE, Fei, YE, Lin, CHANG, Judy C, BEYER, Asheley I, WANG, Jiaming, MUENCH, Marcus O, KAN, Yuet Wai. Seamless gene correction of B-thalassemia mutation in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. **Genome Research**. Vol.24.pp.1526-1533. Ano. 2014.

WANG, Hao, TAO, Zhennan, FENG, Ming, LI, Xuetao, DENG, Zhitong, ZHAO, Guozheng, YIN, Haoran, PAN, Tingzheng, CHEN, Guangliang, ZIBIN, Feng, LI, Yanyan, ZHOU, Youxin, MD, PhD. Dual PLK1 and STAT3 inhibition promotes glioblastoma cells apoptosis through MYC. **Biocheminal and Byophysical Research Communications.** 2020

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO CORTISOL E SEU USO COMO BIOMARCADOR DE ESTRESSE EM ATLETAS

Data de aceite: 01/04/2022

Conceição de Maria Aguiar Carvalho
Programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

Amanda de Castro Amorim Serpa Brandão
Coordenação do Curso de Nutrição
Faculdade Uninassau - Redenção, Teresina-PI

Janyerson Dannys Pereira da Silva
Coordenação do Curso de Nutrição
Faculdade Uninassau - Redenção, Teresina-PI

Luana Mota Martins
Coordenação do Curso de Nutrição
Faculdade Uninassau - Redenção, Teresina-PI

Samuel Guerra Torres
Programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

RESUMO: A determinação da concentração de cortisol pode ser um método relevante em atletas de alto desempenho, uma vez que evidências indicam um aumento das concentrações nesta população e possível relação com a performance. Apesar da relevância e os efeitos produzidos pelo cortisol, as técnicas utilizadas, os padrões de concentração entre os grupos estudados e a correlação entre as concentrações de cortisol encontradas e o desempenho precisam ser ainda avaliados. Neste trabalho foi realizada uma revisão de literatura acerca do potencial do cortisol salivar como marcador bioquímico do estresse competitivo. Os principais métodos de análise, bem como a eficiência dos mesmos e a possibilidade de uso em tempo real, como ferramenta para potencializar performance atlética. Os critérios de inclusão adotados foram: estudos de caráter experimental; delineamento transversal e longitudinal; ensaios clínicos randomizados; nos idiomas inglês e português. As bases de dados eletrônicas LILACS, SCIELO, PUBMED, foram utilizadas para busca de trabalhos publicados nos últimos cinco anos. Concluiu-se que dentre os métodos de imunoensaio com sensibilidade satisfatória para análise do cortisol salivar, o teste de “ELISA” (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi o mais utilizado para diagnostico de estresse competitivo em atletas em tempo real.

PALAVRAS-CHAVE: estresse; cortisol; saliva; atletas.

ABSTRACT: The determination of cortisol concentration could be a relevant method in high performance athletes, since evidence indicate an increase in cortisol levels in this population and a correlation with performance. Despite the relevance and effects produced by cortisol, the techniques used, the concentration patterns among the studied groups and the correlation between the cortisol concentrations and athlete performance still need to be evaluated. This paper reviews the potential of salivary cortisol as a biochemical marker of competitive stress. The main methods of analysis, as well as their efficiency and the possibility of use in real time

as a tool to enhance athletic performance. The inclusion criteria adopted were: experimental studies; transverse and longitudinal design; randomized clinical trials; in the English and Portuguese languages. The electronic databases LILACS, SCIELO, PUBMED were used to search for papers published in the last five years. It was concluded that among the immunoassay methods with satisfactory senility for salivary cortisol analysis, the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was the most used for diagnosing competitive stress in athletes in real time.
KEYWORDS: stress; cortisol; saliva; athletes.

INTRODUÇÃO

A identificação de estresse físico e psicológico além dos padrões de referência tem sido alvo de vários estudos que buscam minimizar o treinamento excessivo de atletas de elite, garantindo desempenho de excelência sem prejuízo a saúde dos competidores. (MEEUSEN, R.; *et al.*, 2013). As concentrações de cortisol constituem uma importante variável de mensuração do estresse, apesar da existência de controvérsias sobre as respostas desse hormônio ao exercício físico (SANTOS *et al.*, 2014).

No pensamento de McArdle; Katch, F.I., Katch (2016), além da ação direta nos níveis pressóricos e glicídicos, o cortisol está diretamente envolvido na resposta ao estresse. A hidrocortisona é sintetizada nas células do córtex das glândulas suprarrenais, sendo controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual é por sua vez, sintetizado na adeno-hipófise. A exposição a situações estressantes de ordem psicológica, física ou mental provoca ativação do HPA (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal), resultando no aumento da secreção de hormônios glicocorticoides, dentre os quais o cortisol se destaca por seu papel na atividade metabólica humana. (BUENO, JR; CMCP, GOUVÊA, 2012).

Na prática esportiva, o cortisol é mensurado como um dos biomarcadores salivares de melhor sensibilidade para apontar o impacto do estresse psicofisiológico nos sistemas de regulação orgânicos. (MOREIRA *et al.*, 2008). Exitindo evidências ainda do aumento das concentrações de cortisol ao exercício físico prolongado, o que pode ser ainda mais sensível em atletas de alto desempenho (JORGE, SANTOS, STEFANELLO, 2010).

Apesar da relevância e os efeitos produzidos pelo cortisol na fisiologia e as alterações no exercício físico, algumas questões ainda precisam ser avaliadas dentre as evidências conhecidas, entre estas: as técnicas utilizadas, os padrões de concentração entre os grupos estudados, a sensibilidade dos métodos e a correlação entre as concentrações de cortisol encontradas e o desempenho apresentado pelos sujeitos da pesquisa.

O presente trabalho teve como objetivo a análise dos delineamentos experimentais, metodologias utilizadas na determinação das concentrações de cortisol e principais resultados das pesquisas que utilizaram o cortisol salivar como marcador bioquímico do estresse competitivo. Além de destacar os principais métodos utilizados, foi discutida a sua

eficiência enquanto ferramenta para potencializar a performance atlética.

METODOLOGIA

Como abordagem nesse estudo foi realizada uma revisão sistemática de literatura, na qual, por meio da utilização de critérios científicos, buscou-se realizar um estudo aprofundado sobre o tema proposto, através do uso de uma metodologia sistematizada para síntese de informações de maior relevância e posterior análise crítica dos resultados obtidos (SAMPAIO E MANCINI, 2007, P. 84). A revisão sistemática foi fundamentada nas orientações de Sampaio e Mancini (2007).

Para a inclusão dos estudos encontrados nas bases de dados foram adotados os seguintes critérios de inclusão: a) estudos de caráter experimental b) com delineamento transversal, longitudinal e ensaios clínicos randomizados c) no idioma inglês e português. Quanto aos trabalhos classificados de cunho qualitativo, artigos de revisão e de opinião, dissertações e teses, cartas ao editor, livros ou capítulos, foram excluídos do estudo.

Com o objetivo de buscar um refinamento na pesquisa dos artigos nas bases de dados, uma combinação de palavras chaves relacionadas ao tema foi submetida a análise pelo DeCS – Descritores em Ciências da Saúde e MeSH - *Medical Subject Headings*, resultando nos seguintes descritores: "*Hydrocortisone/analysis*"[Mesh] (cortisol salivar), *stress* (estresse) e *athletes* (atletas). Buscando-se evitar dispersão nos termos utilizou-se operador booleano "AND"

Com o intuito de prezar pela atualidade dos resultados, as bases de dados eletrônicas LILACS, SCIELO, PUBMED, foram consultadas retrospectivamente até o ano de 2014, procedimento que ocorreu durante o mês de setembro do ano de 2021. Em virtude do avanço cientifico de estudos na área, optou-se pela delimitação de artigos com texto completo, e cujas pesquisas foram realizadas em humanos, e com a descrição de resultados quantitativos.

A busca dos artigos seguiu cinco etapas, como seguem: 1) Pesquisa por meio de descritores; 2) Leitura e exclusão dos títulos repetidos; 3) Leitura dos resumos e exclusão dos artigos que não atenderam aos critérios de inclusão; 4) Leitura do artigo completo e 5) Inclusão dos artigos eleitos na revisão. O fluxograma que segue, Figura 1, resume a busca dos artigos com o respectivo número de estudos identificados em cada etapa de busca. Ao final, um total de nove artigos foram eleitos para a análise das informações e pesquisa realizada sobre a temática abordada.
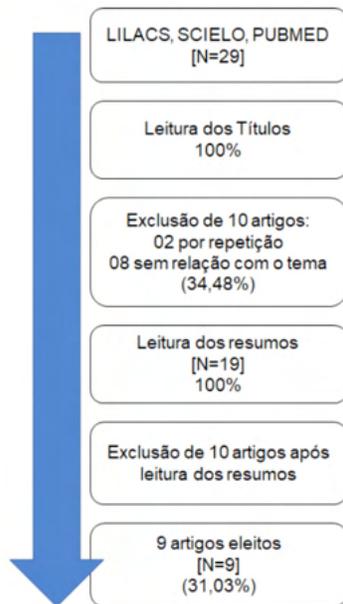
Figura 1 – Fluxograma de busca, seleção e exclusão dos artigos.

Fonte: Autoria própria, 2022.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo descrevemos informações relacionadas à determinação do cortisol em atletas e a sua relação com a presença de estresse, com abordagem de revisão sistemática. Foram avaliados os delineamentos dos estudos, sujeitos envolvidos na pesquisa, principais resultados e desfechos das intervenções.

Os sujeitos integrantes de seis dos estudos selecionados se propuseram a participar dos experimentos de forma voluntária, caracterizando-os como não randomizados. Em três dos trabalhos ocorreu de forma eletiva a escolha dos praticantes, configurando tais pesquisas como randomizadas. Ainda nesse aspecto, se faz necessário realizar uma ressalva aos achados de Kilian *et al.* (2016), que realizaram um estudo de caráter prospectivo.

Fato que merece destaque foi que todos os experimentos elegeram como participantes dos delineamentos, sujeitos indivíduos jovens, o que pode induzir a premissa de que as oscilações da hidrocortisona em decorrência de situação de estresse, considerando que são mais facilmente detectadas na referida classificação etária, podendo ser esta uma sugestão para realização de futuras investigações.

No texto de Silva *et al.* (2014), os autores afirmam que, em competidores de elite, o cortisol apresenta-se como um marcador simples e eficiente do estresse competitivo, sendo sua concentração em mulheres maior do que a observada no sexo masculino. Tal pensamento pode explicar predominância do gênero feminino em mais da metade dos

estudos analisados.

Uma das observações mais relevantes do trabalho foi a de que a maioria dos pesquisadores elegeram ensaios de imunoabsorção enzimática para mensuração dos níveis de cortisol salivar. Apenas dois estudos não adotaram tal técnica (Khaustova, 2010 e Vacher, P.2019), ao optarem por realizar a análise da saliva respectivamente por calorimentria quantitativa e espectroscopia de massa.

O teste de "ELISA" (do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*), caracterizado como modelo simples (ou direto), tem como base a reação específica do antígeno-anticorpo, o qual é fixado a uma placa para posterior incubação do soro no qual busca-se a existência de anticorpos em contato com outro segundo anticorpo antiimunoglobulina marcado com enzimas. (NT'ANNA, *et al.*, 2001). A mesma literatura aponta ainda o modelo denominado ELISA de bloqueio (ou competição), no qual o anticorpo presente no soro é exibido e mostrado pela competição com um anticorpo específico dirigido contra o antígeno.

Apesar de técnicas laboratoriais como a cromatografia radioimunoensaio, o ensaio de eletroquimioluminescência e o ensaio imunoenzimático serem consideradas como "padrão ouro" para detecção de cortisol, tais análises se caracterizam como sistemas complexos cuja extração/purificação das amostras acontecem em múltiplas etapas, e cujo tempo de resposta da amostragem aos resultados se caracteriza como demorado, podendo ocorrer em um período de dias a algumas semanas. (KLOPFENSTEIN, PURNELL, *et al.*, 2011).

Khaustova *et al.* (2010) destaca que na atualidade a ciência dispõe de um amplo leque de métodos para análise dos fluídos corporais, além dos métodos tradicionais empregados nos estudos em questão. Dentre estes, merece destaque a espectroscopia de massa, caracterizada como uma medida, relativamente nova e muito promissora, por ser menos invasiva, necessitar de um controle metodológico menor e possibilitar uma redução nos gastos com análises bioquímicas.

Não poderíamos deixar de destacar que, dentre os métodos espectroscópicos viáveis para a análise de fluídos corporais como a saliva, Karkoulia *et al.* (2008) afirma que, a Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), e a espectroscopia Raman, tem sua utilização cada vez mais comum pelos pesquisadores.

Uma última observação se faz em relação ao protocolo de intervenção adotado no estudo de O'donnell *et al.* (2018), no qual a coleta do material foi realizada pré e pós exposição ao fator estressante, bem como antes do deitar. A explicação para tal procedimento pode ser apoiada nas palavras de Hofstra & De Weerd (2008), que afirmam ser o ciclo circadiano apontado como principal influenciador do processo produtor e excretor do cortisol, levando ao alcance de níveis máximos após a metade do período matutino, seguido de declínio ao longo do dia, alcançando valor mais significativos no início da noite, e elevando-se paulatinamente após 2 horas de sono.

Os nove artigos selecionados foram analisados e encontram-se de forma resumida

na tabela que segue, descrevendo em cada estudo o método de análise do cortisol e o protocolo de intervenção adotado.

Autor (ano)	**Delineamento do estudo**	**Sujeitos**	**Objetivo**	**Método de análise do cortisol**	**Protocolo de intervenção**	**Desfechos**
S. Odonnell et al. (2018)	Experimental não randomizado	10; sexo: F; 23 ± 6 anos	Avaliar cortisol salivar (sC) e marcadores de estresse perceptivo (durante competição e treinamento). Determinar os efeitos subsequentes sobre o sono	Imunoensaio enzimático	Sono monitorado após: um dia de competição, de treinamento e de descanso. Valores de estresse percebidos e sC coletados e correlacionados com a qualidade do sono.	🡅sC ,🡇quantidade e qualidade do sono pós competição (se comparada treinamento e descanso.)
Arruda, et al. (2017)	Experimental não randomizado	20; sexo: M; 18,6 ± 0,5 anos	Avaliar o efeito do nível do adversário na concentração testosterona (T) e cortisol (C), e na ansiedade pré-competitiva	Imunoensaio enzimático	3 partidas oficiais e 1 treinamento (condição controle). T coletada pré-partida; C pré-pós-partida; ansiedade pré-competitiva avaliada por inventário (CSAI-2), após o treino e após jogos oficiais.	Oponente de alto nível, leva a estresse mais alto .
Crewther BT, et al. (2017;)	Experimental randomizado	71 sexo: M (18,1 ± 1,2 anos); F(17,6 ± 1,2 anos)	Examinar o uso de testosterona salivar (T) e cortisol (C) na avaliação das respostas agudas ao estresse de atletas juniores durante competição.	Imunoensaio enzimático	Sangue e saliva coletadas (antes/ depois) de competição. Medidas T e C referenciadas contra as concentrações totais de sangue T (TT) e C (CT).	Competição promoveu 🡅 de TT e CT, induzido pelo estresse. Respostas ao estresse na saliva não observada.
Kilian Y et al. (2016)	Experimental randomizado	10 sexo: M: 14,4 ± 0,8 anos	Comparar efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) e treinamento de alto volume (HVT) nos marcadores de estresse salivar e resposta metabólica e cardiorrespiratória em atletas jovens .	Imunoensaio enzimático	sC eT antes e após HIIT e HVT. Estresse caracterizado por lactato e PH sanguíneos, razão de troca respiratória (RER) e (FC), captação de oxigênio , ventilação (V E) e equivalente ventilatório	Estresse metabólico e cardiorrespiratório no HIIT 🡅 em comparação ao HVT. Analises sC sem efeitos catabólicos agudos, nem pelo HIIT nem pelo HVT.
De Pêro R et al. (2016)	Experimental não randomizado	11 Sexo: F; 21±0,8 anos	Investigar a relação entre estresse competitivo, intensidade do exercício e resultado de uma competição de TeamGym (ginastica feminina) .	Imunoensaio enzimático	Inventário de ansiedade: pré competição . amostras de sAA e sC coletadas antes e após a competição, e após cada aparelho.	🡅🡅 no sAA e ansiedade. sC permaneceu estável. Correlação significativa entre ASA, estado de ansiedade e competição.

Vacher, P. (2019)	Experimental não randomizado	15 F:6 ;M:9 media idade (17,8)	Investigar variações de tempo e relação carga de treinamento (TL =stresse) e parâmetros psicológicos e fisiológicos	Calorimen-tria quanti-tativa	Saliva coletada (imediatamente após acordar; 30, 60 min, 20hs antes do jantar. Amostras congeladas para analise posterior com kit cortisol EIA	Estados psicológicos e fisiológicos não seguem a mesma dinâmica na periodização do treinamento
Khaustova, (2010)	Experimental randomizado	48 F: média idade (22,1 ± 6 anos)	Desenvolver um método para monitorar alterações metabólica causadas pelo exercício por meio da analise da saliva por ATR FTIR	Espectros-copia FT-IR	Saliva coletada pré e pos exercício. Espectros registrados na região de 4000–600 cm 1 usando o espectrômetro FTIR	Espectroscopia mostrou-se adequada para verificação em tempo real da resposta ao estresse.
Sinnott-O'Connor (2018)	Estudo experimental não Randomizado	4 M:1; F:3 (19 ± 4 anos)	Examinar relação: Carga de treinamento (CT: normal, intenso, afunilado) e biomarcadores salivares: IgA, alfa-amilase (aAA), cortisol	Imunoensaio enzimático	Saliva coletada quinzenalmente a cada aumento da CT nas fases Saliva coletada diariamente em período de competição (despertar, 30min pré e pós exercício).	↑↑ sIgA, sAA ; sC: treino intensificado; ↓ sIgA, sAA esC: T afunilado. ↑↑sIgA, sAA e sC: durante competição Desempenho em grandes competições ↔ estress
Peñailillo LE (2018)	Estudo experimental não Randomizado	12 F e M média idade (22 – 24,3)	Comparar as alterações sC em homens e mulheres em competição e analisar possíveis correlações entre alterações hormonais e Taxa de Esforço Percebido (TEP)após a partida.	Imunoensaio enzimático	Durante experimento: 3 partidas do campeonato. sC e T medidos em jejum, antes e após cada partida. Taxa de esforço percebido (EPR) foi avaliada após cada partida.	[sC jejum] > em F. [Tjejum]> em M TEP foi correlacionada com a alteração nos níveis de testosterona, em M e F Respostas hormonais de F e M são ≠ e estão relacionadas ao seu esforço durante as partidas.

Tabela 1- Descrição dos estudos selecionados nas bases de dados, segundo autoria do trabalho, delineamento e objetivos da pesquisa.

Fonte: Autoria própria, 2022.

CONCLUSÕES

Ao final desta pesquisa foi possível concluir que os estudos da área encontram-se bem substanciadas, porém, vale mencionar que um limitante vivenciado no decorrer do estudo foi a obtenção de artigos de acordo com a especificidade dos descritores.

Em relação às variáveis utilizadas nos artigos, a maioria dos experimentos foi delineada de forma não randomizada, e utilizou voluntários jovens e do sexo feminino, induzindo conclusões de que tais características poderiam influenciar nos resultados finais

das pesquisas.

Outro ponto que merece destaque foi a predominância na utilização de métodos de imunoensaio para análise do cortisol salivar. Observou-se que o teste de "ELISA" (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) foi apresentado como o mais utilizado em pesquisas que relacionam os níveis de cortisol salivar ao estresse em competidores de elite, possivelmente devido a sensibilidade e facilidade de coleta de amostras oferecida pelo método.

Cabe ainda mencionar a necessidade de uma maior exploração de temas relacionas a utilização de métodos alternativos, como as análises espectroscópicas, que além de se mostrarem eficazes, com rendimentos aceitável e menos onerosas, são realizadas de forma rápida e como tempo de análise inferior, se comparado a outras técnicas.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, A. F. S.; *et al.* Salivary steroid response and competitive anxiety in elite basketball players: Effect of opponent level. **Physiology & Behavior**, v.177, p.291–296. doi:10.1016/j.physbeh.2017.05.017

CREWTHER, B.T.; *et al.* The utility of salivary testosterone and cortisol concentration measures for assessing the stress responses of junior athletes during a sporting competition**. J Clin Lab Anal**. v.32, n.1, 2018. doi: 10.1002 / jcla.22197.

DE PÊRO, R.; ***et al.*** Alterações relacionadas ao estresse durante a competição TeamGym. J Sports Med Phys Fitness. **n.** 56, v. 5, p. 639-47.2016.

JORGE, S. R.; SANTOS, P. B.; STEFANELLO, J. M. F. O cortisol salivar como resposta fisiológica ao estresse competitivo: uma revisão sistemática. **R. da Educação Física/ UEM**, v. 21, n. 4, p. 677-686, 4. Trim. 2010. DOI: 10.4025/reveducfis.v21i4.9053

KILIAN, Y.; *et al.* Markers of biological stress in response to a single session of high-intensity interval training and high-volume training in young athletes. **European Journal of Applied Physiology**, v.116, n 11-12, p. 2177–2186. doi:10.1007/s00421-016-3467-y

KHAUSTOVA, S.; *et al.* Monitoramento bioquímico não invasivo do estresse fisiológico pela espectroscopia de saliva no infravermelho por transformada de Fourier. **The Analyst**, v.135, n.12, p.3183.2010. doi: 10.1039/c0an00529k

O'DONNELL, S.; Bird, S.; Jacobson, G.; & Driller, M. Sleep and stress hormone responses to training and competition in elite female athletes. **European Journal of Sport Science**, v.8, n.5, p.611–618, 2018. doi:10.1080/17461391.2018.1439535

SANTOS, P. B.; MACHADO, T. A.; OSIECKI, A. C. V.; GÓES, S. M.; LEITE, N.; STEFANELLO, J. M. F. A necessidade de parâmetros referenciais de cortisol em atletas: Uma revisão sistemática. **Motricidade**, vol. 10, n. 1, pp. 107-125, 2014. http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.10(1).2610

VACHER, P.; *et al.* Estresse e recuperação no esporte: efeitos na variabilidade da frequência cardíaca, cortisol e experiência subjetiva. **Rev. Internacional de Psicofisiologia**. 2016. doi: 10.1016 / j.ijpsycho.2019.06.011

CAPÍTULO 3

MODELAGEM E ANÁLISE DE TENSÕES DE UMA PRÓTESE PARA MEMBROS INFERIORES DO TIPO *FLEX*

Data de aceite: 01/04/2022

Elias Dagostini

Fábio Rodrigo Mandello Rodrigues

RESUMO: A falta de atividades físicas regulares está diretamente ligada à saúde emocional e física do ser humano. Além disso, amputações de membros inferiores implicam em sérias dificuldades de mobilidade, consequentemente na redução da prática de atividades físicas. Este trabalho analisa as tensões em uma prótese inferior do tipo *flex*, que é a mais indicada para a prática de atividades físicas por amputados. Foi realizada a modelagem com três variações de ângulos internos, selecionados três materiais para constituírem a lâmina da prótese e ainda, encontradas condições de contorno que simulam o uso real da prótese. As análises foram realizadas por meio do método dos elementos finitos. Os resultados de tensões equivalentes de cada cenário foram comparados entre si, tornando possível a conclusão de que próteses com ângulos menores, com os parâmetros testados, sofrem solicitações maiores; ainda, que a modelagem proposta permite o emprego de dois dos materiais selecionados na fabricação da prótese, um terceiro material selecionado apresentou falhas devido à sua baixa resistência ao escoamento sob compressão.**PALAVRAS-CHAVE:** Biomecânica. Método dos Elementos Finitos. Compósitos. Reabilitação de amputados.

ABSTRACT: The lack of regular physical activities is directly related to human emotional and physical health. In addition, lower limb amputations imply in serious mobility difficulties, consequently in a reduction on the practice of physical activities. This work analyzes the tensions in an inferior flex-type prosthesis, which is the most suitable for the practice of physical activities by amputees. The modeling was carried out with three variations of internal angles, three materials were selected to constitute the prosthesis blade and also found contour conditions that simulate the real use of the prosthesis. The analyzes were realized through the finite element method. The results of equivalent stress in each scenario were compared to each other, making it possible to conclude that prostheses with smaller angles, with the parameters tested, are subject to greater demands; also, that the proposed model allows the use of two of the selected materials in the manufacture of the prosthesis, a third selected material presented failures due to their low compressive yield strength.

KEYWORDS: Biomechanics. Finite Element Method. Composites. Rehabilitation of amputees.

INTRODUÇÃO

Estudos apontam que a prática regular de exercício físico está diretamente relacionada à saúde humana, podendo promover benefícios à saúde emocional e física. Por outro lado, a inatividade física gera riscos à saúde, uma vez que é responsável pelo mesmo número de

doenças quanto o tabagismo (PENEDO; DAHN, 2005). Ademais, a prática de exercícios físicos previne o início da depressão e contribui para o seu tratamento, melhora o humor e diminui o stress. Pessoas com quadro de depressão que, juntamente ao tratamento psicológico, têm uma rotina de exercício físico, acabam tendo uma melhor recuperação quando comparadas àquelas que passam apenas pelo tratamento psicológico regular (PENEDO; DAHN, 2005).

No ano de 2008, a inatividade física foi responsável por 3,5 milhões de mortes no mundo. Ao encontro disso, com a redução de 25% da inatividade física, a expectativa de vida da população mundial aumentaria em 0,68 anos (LEE et al., 2012). Uma das doenças que têm sua incidência aumentada pela falta de atividades físicas, a diabetes Mellitus, é o principal motivo de amputações de membros inferiores, sendo responsável por 80% delas. Amputação é um recurso médico que consiste na remoção de um membro, saliência ou apêndice, na tentativa de melhorar as condições vitais de um paciente (PEIXOTO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2011). Amputações de membros inferiores podem causar sérias dificuldades de locomoção e, consequentemente, impedir ou reduzir significativamente a prática de exercícios físicos. Considerando os riscos causados pela inatividade física, se faz necessária a redução dessas dificuldades, a fim de possibilitar a prática de esportes e melhorar a saúde dos amputados (KE *et al.*, 2017).

Uma solução interessante para a inclusão de amputados de membros inferiores à prática de atividades físicas são as próteses inferiores do tipo *flex.* Esse tipo de prótese é projetada para simular o comportamento de uma perna biológica durante uma corrida ou caminhada e sua forma construtiva permite a prática do exercícios com uma absorção de energia otimizada, gerando menos desgaste ao indivíduo (BRAGARU, DEKKER E GEERTZEN, 2012). Próteses do tipo *flex* são largamente utilizadas por atletas paraolímpicos nas modalidades de atletismo, porém são poucas as pesquisas que relacionam a geometria da prótese com as tensões geradas (KE *et al.*, 2017; VOLPATO, 2018).

OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar, pelo método de elementos finitos, as tensões em próteses do tipo *flex* considerando a geometria e o material.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor variações às geometrias e materiais já utilizados em trabalhos anteriores;
- Modelar tridimensionalmente a prótese em *software* de CAD 3D;
- Determinar os esforços presentes na prótese;
- Determinar as tensões através do método dos elementos finitos;

- Verificar, quanto às tensões, a utilização de diferentes materiais na lâmina da prótese;
- Verificar, quanto às tensões, a influência de diferentes ângulos na geometria da lâmina.

DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento deste trabalho se deu na sequência das etapas apresentadas na Figura 1. Primeiramente, foi realizada a seleção de três compósitos para constituírem a lâmina da prótese tipo *flex* e serem comparados entre si. Posteriormente, foi realizada uma análise no trabalho de KE *et al.*, 2017 e definidos três ângulos, A, B e C, conforme a Figura 2.
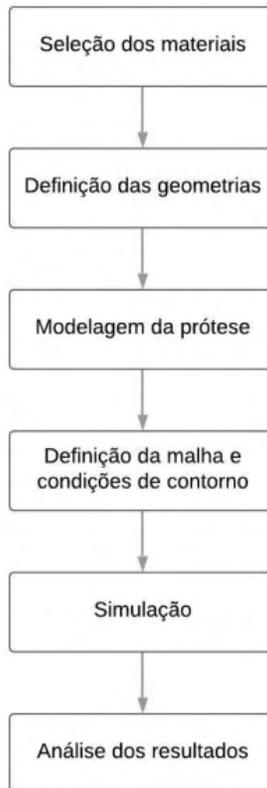
Figura 1. Fluxograma das etapas.

Fonte: Autoria própria.
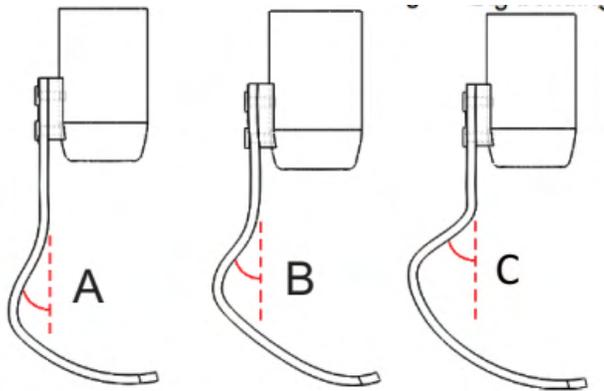
Figura 2. Geometria da prótese adotada.

Fonte: Adaptado de KE et al., 2017.

A modelagem se deu por meio do um *software* de *Computer Aided Design* (CAD). A definição de malha e a simulação por elementos finitos foram realizadas no software comercial Ansys 2021 R1, utilizando de sua versão estudantil. Foram selecionados três materiais compósitos para fazer parte da análise. Os materiais foram selecionados do site matweb.com, que reúne mais de 150 mil fichas de dados de materiais comerciais, sendo eles metais, polímeros, cerâmicos e compósitos (MATWEB, 2021a). Os critérios de pesquisa no site foram: possuir limite de escoamento cadastrado, já que em alguns casos essa informação não é informada; ser um compósito e possuir um módulo de elasticidade superior à 20GPa, para assim manter uma proximidade ao trabalho de KE *et al.* Assim, os materiais comerciais selecionados foram:

- Hexcel® HexPly® M42 52%/G1177 Glass/Carbon Fiber, que consiste em um compósito com 52% em massa de um tecido híbrido de fibra de carbono e fibra de vidro como reforço. Para facilitar a fluidez do texto, este material será denominado "Material 1" (MATWEB, 2021b).
- Hexcel® HexPly® M42 50%/G939 HS Carbon (material 2), um compósito com matriz constituída da mesma resina epóxi do material 1, porém, com 50% em massa de reforço composto por uma fibra de carbono de alta resistência (MATWEB, 2021c).
- Hexcel® HexPly® F155 Epoxy Resin, K285 Kevlar Fabric (material 3). O material 3 consiste em um compósito com matriz de epóxi e reforço de fibra de aramida, com 46% em massa (MATWEB, 2021d).

Todos os materiais serão considerados isotrópicos e em regime linear elástico (KE *et al.*, 2017). As propriedades se encontram na Tabela 1.

Material	Módulo de Young (GPa)	Poisson	Limite de escoamento sob compressão (MPa)
Material 1	37	-	590
Material 2	62,8	-	730
Material 3	30,3	-	261
Material 0-1	58,5	0,30	-
Material 0-2	1,6	0,39	-
Material 0-3	210	0,30	-

Tabela 1. Propriedades dos materiais adotados.

Fonte: KE et al., 2017; Matweb 2021d, 2021c, 2021b.

A modelagem se deu, assim como a modelagem do estudo de KE *et al*. 2017, foi efetuada por semelhança das próteses Flex-Foot Cheetah Xtend (J-shaped) da fabricante Össur (Figura 8-b) observadas no mercado. A prótese apresenta quatro elementos, representados na Figura 3. O acoplamento (item 3) faz a conexão entre a prótese e o membro residual do usuário, a junção (item 2) é responsável pela conexão do acoplamento e a lâmina, e a base (item 1) é responsável por simular o solo, uma base de apoio para a prótese; por último, a lâmina. Para a simulação foram adotados os materiais das Tabelas 1 e 2.
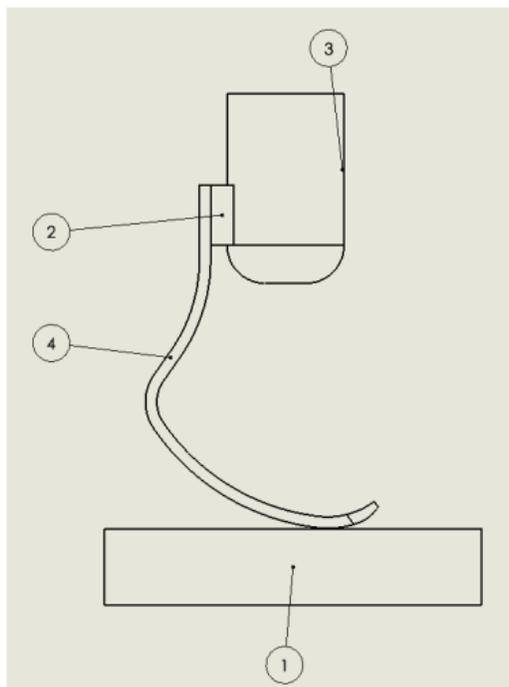
Figura 3. Elementos modelados da prótese.

Fonte: Autoria própria.

Elemento	Material
Elemento 1	Material 0-3
Elemento 2	Material 0-3
Elemento 3	Material 0-2
Elemento 4	Material 0-1

Tabela 2 – Atribuição dos materiais aos elementos da modelagem.

Fonte: Adaptado de KE et al., 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Simulação 1

Na primeira simulação, foi testada a geometria 1, com os materiais 0-1, 0- 2 e 0-3, com a condição de esforços 1, que simula uma pessoa ereta, com apenas a prótese suportando o seu peso. O ponto que sofre a maior tensão, 63,203MPa nas condições

da simulação 1 é exibido na Figura 4. Na mesma figura é possível observar o perfil das tensões atuantes na prótese.
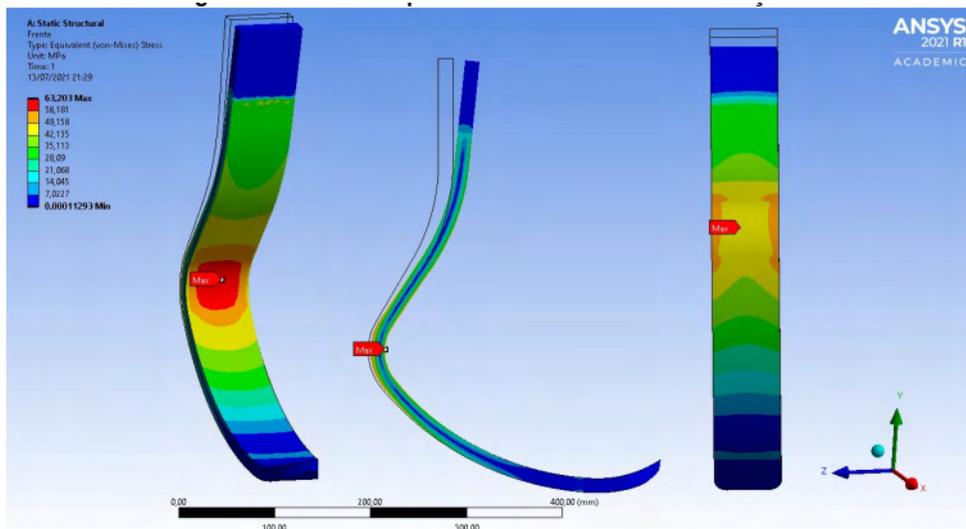
Figura 4. Tensões equivalentes de Von Mises – Simulação 1.

Fonte: Autoria própria.

Simulação 2

Na simulação 2, foi testada a geometria 2, com os materiais 0-1, 0-2 e 0-3, e condição de esforços 1. As tensões equivalentes de Von Mises da simulação 2 são exibidas na Figura 5, a tensão equivalente máxima para a simulação 2 foi de 62,296MPa.
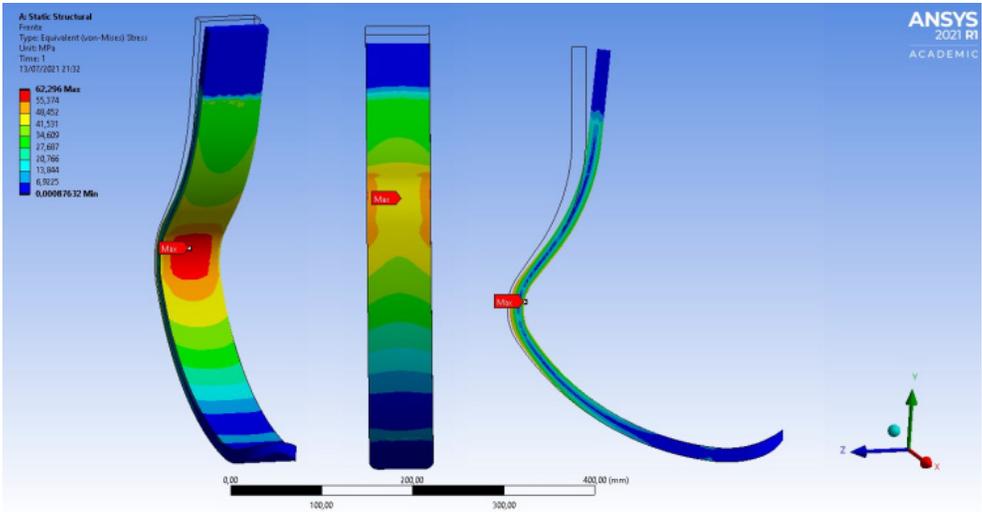
Figura 5. Tensões equivalentes de Von Mises – Simulação 2.

Fonte: Autoria própria.

Simulação 3

Na simulação 3, foi testada a geometria 3, com os materiais 0-1, 0-2 e 0-3, e condição de esforços 1. As tensões equivalentes de von Mises da simulação 3 podem ser observadas na Figura 6. A tensão equivalente máxima experimentada pela prótese nas condições da simulação 3 foi de 62,341Mpa.
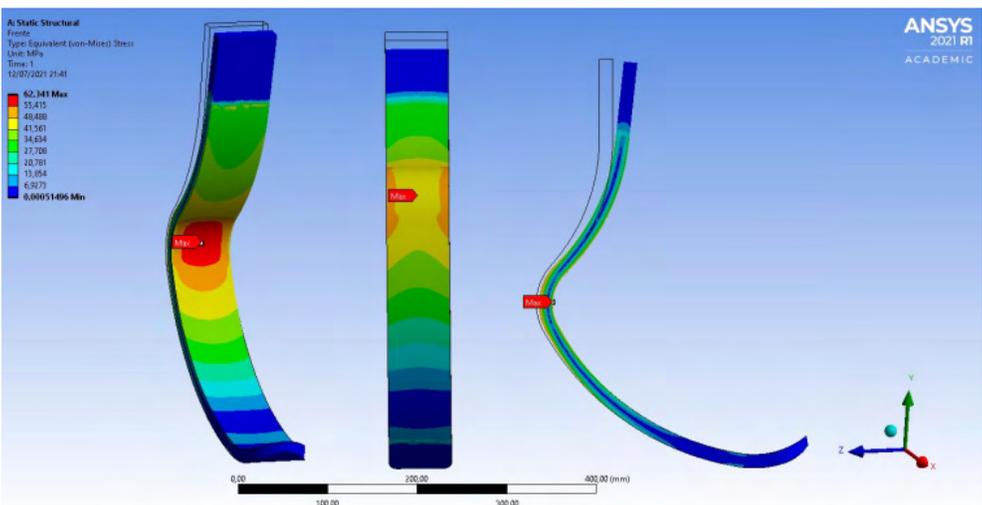
Figura 6. Tensões equivalentes de Von Mises – Simulação 3.

Fonte: Autoria própria.

Simulação 4

A simulação 4 testa a geometria 1, sob a atuação dos esforços 2, que simula uma pessoa em marcha de corrida. Os materiais utilizados na simulação ainda são os 0-1, 0-2 e 0-3. Na Figura 7 estão as tensões equivalentes resultantes dos parâmetros da simulação 4, bem como o marcador indicando a localização da tensão máxima observada, que é de 369,34MPa.
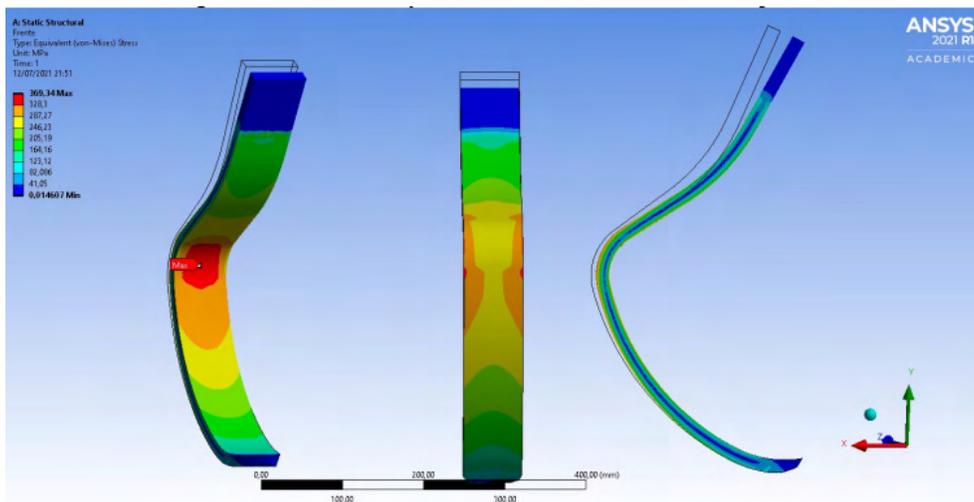
Figura 7. Tensões equivalentes de Von Mises – Simulação 4.

Fonte: Autoria própria.

Simulação 5

Também na simulação 5, os esforços testados são os de corrida (condição 2), os materiais continuam sendo 0-1, 0-2 e 0-3, porém a geometria utilizada é a geometria de número 2, com 35º. Na Figura 8 podem ser verificadas as tensões equivalentes de von Mises, resultantes das condições empregadas na simulação 5. A tensão máxima equivalente para essa simulação foi de 357,47MPa.
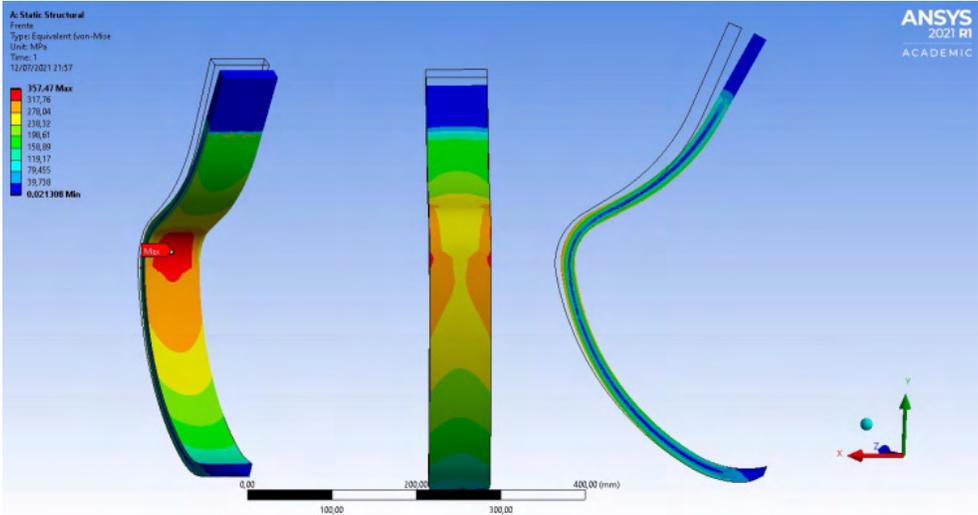
Figura 8. Tensões equivalentes de Von Mises – Simulação 5.

Fonte: Autoria própria.

Simulação 6

Na simulação de número 6, a geometria empregada foi a 3, com ângulo de 40º. Os esforços e os materiais foram os mesmos das últimas duas simulações (condição de esforços 2 e materiais 0-1, 0-2 e 0-3). As tensões equivalentes de von Mises, resultantes das condições da simulação 6, podem ser observadas na Figura 9. A tensão equivalente máxima para a simulação 6 foi de 349,28MPa.
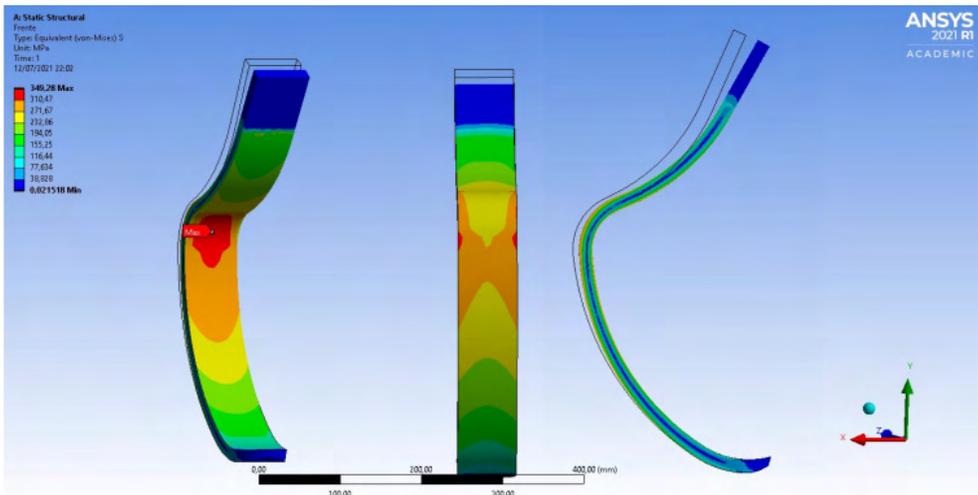
Figura 9. Tensões equivalentes de Von Mises – Simulação 6.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 3 estão reunidas as tensões equivalentes de von Mises máximas. Por meio da tabela, fica explícito o degrau de tensões entre as primeiras três simulações e as últimas três, isso por conta da diferença nas condições de contorno dos problemas.

Teste	Tensão máxima (MPa)
Simulação 1	**63,203**
Simulação 2	**62,296**
Simulação 3	**62,341**
Simulação 4	**369,34**
Simulação 5	**357,47**
Simulação 6	**349,28**

Tabela 3 – Atribuição dos materiais aos elementos da modelagem.

Fonte: Autoria própria.

É notória a evolução das tensões em relação aos ângulos da geometria, para as duas condições de contorno, as geometrias com ângulos menores apresentaram tensões maiores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do desenvolvimento deste trabalho, foi possível modelar uma prótese do tipo *flex,* propondo alterações no modelo de trabalhos anteriores e aplicando diferentes materiais comerciais. Além disso, com o estudo do trabalho de outros autores, foram determinadas as condições de contorno que simulam o uso da prótese. Mediante a definição da modelagem e das condições de contorno, a simulações foram executadas, resultando nas tensões equivalentes de von Misses.

Com a análise das tensões e comparação com a resistência dos materiais escolhidos, foi constatado que dois dos materiais selecionados passam nas verificações realizadas e um terceiro material apresenta falhas, por conta da sua baixa resistência ao escoamento sob compressão. Também com a análise das tensões equivalentes, mas agora em comparação com os ângulos testados, os resultados indicaram que, à medida que ângulos maiores foram utilizados, as tensões experimentadas pela prótese foram menores, o que contrariou os resultados do trabalho de KE *et al.*, 2017, porém a diferença nos resultados pode ser explicada por diferenças entre as modelagens dos trabalhos.

REFERÊNCIAS

PENEDO, F. J.; DAHN, J. R. Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 18, p. 189–193, 2005.

LEE, I.-M.; SHIROMA, E. J.; LOBELO, F.; et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219–229, 2012.

PEIXOTO, A. M.; ZIMPEL, S. A.; OLIVEIRA, A. C. A. DE; MONTEIRO, R. L. S.; CARNEIRO, T. K. G. Prevalência de amputações de membros superiores e inferiores no estado de Alagoas atendidos pelo SUS entre 2008 e 2015. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 24, n. 4, p. 378–384, 2018.

SILVA, R. DA; RIZZO, J. G.; FILHO, P. J. B. G.; RAMOS, V.; DEANS, S. Physical activity and quality of life of amputees in southerns Brazil. **Prosthetics and Orthotics International**, v. 35, n. 4, p. 432–438, 2011.

KE, M.-J.; HUANG, K.-C.; LEE, C.-H.; et al. Influence of three different curvatures flex-foot prosthesis while single-leg standing or running: a finite element analysis study. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 17, n. 03, p. 1750055, 2017.

BRAGARU, M.; DEKKER, R.; GEERTZEN, J. H. B. Sport prostheses and prosthetic adaptations for the upper and lower limb amputees. **Prosthetics & Orthotics International**, v. 36, n. 3, p. 290–296, 2012.

VOLPATO, A. C. **Influência da utilização de próteses específicas nas demandas energéticas da corrida: uma revisão sistemática**, 2018. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina

MATWEB. Online Materials Informations Resource - MatWeb. Disponível em: <http://www.matweb.com/index.aspx>. Acesso em: 14/4/2021a.

MATWEB. Hexcel® HexPly® M42 180°C (350°F) Curing Epoxy Matrix, 52%/G1177 Glass/Carbon Fiber. Disponível em: <http://www.matweb.com/search/DataSheet.aspx?MatGUID=fe1cca85145a40dfae39a6d5261cc447>. Acesso em: 14/4/2021b.

MATWEB. Hexcel® HexPly® M42 180°C (350°F) Curing Epoxy Matrix, 50%/G939 HS Carbon. Disponível em: <http://www.matweb.com/search/DataSheet.aspx?MatGUID=a4251d9ad5a04c259bd79d03dcdcf987>. Acesso em: 14/4/2021c.

CAPÍTULO 4

MONITORAÇÃO NÃO INVASIVA DA PRESSÃO INTRACRANIANA EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Data de aceite: 01/04/2022

Data de submissão: 30/03/2022

Claudiane Ayres
Mestre em Ciências Biomédicas (2018)
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil
http://lattes.cnpq.br/9434584154074170

José Carlos Rebuglio Vellosa
Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (2008)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil
http://lattes.cnpq.br/1522293867934005

Gustavo Henrique Frigieri Vilela
Doutor em Ciências - Física Biomolecular (2010)
Braincare Health Technology, São Carlos, SP,Brasil
http://lattes.cnpq.br/0396454914702330

Danielle Cristyne Kalva Borato
Mestre em Ciências Farmacêuticas (2011)
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil
http://lattes.cnpq.br/1550916899076200

Cristiane Rickli Barbosa
Mestre em Ciências Farmacêuticas (2016)
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil.
http://lattes.cnpq.br/1860420854722544

RESUMO: Introdução: A pressão intracraniana (PIC) resulta da somatória dos volumes dos conteúdos cranianos. Acredita-se que as doenças cardiovasculares (DCVs) possam desencadear alterações metabólicas que levam ao aumento da volemia ou a edema cerebral, e isto, consequentemente, pode acarretar em modificações na PIC. As DCVs afetam grande parcela da população mundial e apesar dos avanços em relação ao tratamento clínico e farmacológico dessas doenças, a cirurgia cardíaca é a intervenção frequentemente, mais utilizada, porém, pacientes submetidos a tais procedimentos geralmente apresentam complicações cardiopulmonares. Portanto, a PIC pode ser um importante parâmetro a ser avaliado em pacientes com DCV, bem como, em pacientes submetidos a cirurgias para o tratamento destas doenças, uma vez que as flutuações da PIC são determinadas por parâmetros respiratórios e cardíacos. Objetivo: Monitorar a PIC de pacientes no pré e pós-operatórios de cirurgias cardíacas e identificar possíveis relações da PIC com a função cardiovascular. Método: Foram avaliados a PIC de forma não invasiva de 54 pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca. Resultados: No pré- operatório 27 pacientes apresentaram morfologia alterada do traçado de PIC e valores de P2/P1 maiores que 1,0, indicando alteração da complacência cerebral, e consequentemente da PIC. No pós-operatório, 16 apresentaram melhora em relação à morfologia de traçados de PIC e da P2/P1 no pós- operatório, obtendo valores abaixo de 0,9; indicando normalidade. Conclusão: Alterações do sistema cardiovascular podem alterar a

complacência cerebral e, consequentemente a PIC dos indivíduos acometidos, portanto, torna-se importante a recomendação da aferição da PIC em pacientes cardiopatas.
PALAVRAS-CHAVE: Cirurgia torácica; pressão intracraniana; doença cardiovascular.

NON-INVASIVE MONITORING OF INTRACRANIAN PRESSURE IN CARDIOVASCULAR DISEASES

ABSTRACT: Introduction: Intracranial pressure (ICP) results from the summation of cranial contents volumes. It is believed that cardiovascular diseases can trigger metabolic alterations that lead to increased blood volume or cerebral edema, and this, consequently, can lead to modifications in ICP. Cardiovascular diseases affect a large part of the world population, and despite advances in clinical and pharmacological treatment of these diseases, cardiac surgery is the most frequently used intervention, but patients submitted to such procedures usually present cardiopulmonary complications. Therefore, ICP may be an important parameter to be evaluated in patients with cardiovascular disease, as well as in patients undergoing surgeries for the treatment of these pathologies, since ICP fluctuations are determined by respiratory and cardiac parameters. Objective: To monitor the ICP of patients in the pre and postoperative of cardiac surgeries and to identify possible relations of ICP with cardiovascular function. Method: A noninvasive ICP of 54 patients was evaluated before and after heart surgery. Results: In the preoperative period, 27 patients presented altered morphology of the ICP tracing and P2 / P1 values greater than 1.0, indicating a change in cerebral compliance, and consequently of ICP. In the postoperative period, 16 presented an improvement in the morphology of ICP and P2 / P1 tracings in the postoperative period, reaching values below 0.9; indicating normality. Conclusion: Alterations of the cardiovascular system can alter the cerebral compliance and, consequently, the ICP of the affected individuals, therefore, it is important to recommend the measurement of ICP in patients with heart disease, regardless of surgical indication.
KEYWORDS: Thoracic surgery; intracranial pressure; cardiovascular disease.

INTRODUÇÃO

A pressão intracraniana (PIC) resulta da somatória dos volumes dos conteúdos cranianos (volume sanguíneo cerebral, volume do líquido cefalorraquidiano e do parênquima cerebral)[1]. O aumento de um ou mais destes componentes cranianos pode desencadear a elevação da PIC[2]. Porém, em situações que provocam o aumento do volume de algum dos componentes, o próprio organismo realiza uma compensação, que faz com que haja a diminuição dos outros componentes, para que não ocorra aumento da PIC, além disso, o crânio consegue realizar pequenas deformações em seu diâmetro, a fim de minimizar a possível compressão intracraniana. A essa capacidade compensatória e de deformidade dá-se o nome de complacência[1,2].

A complacência intracraniana é a capacidade do crânio de tolerar aumentos no volume sem um aumento correspondente na PIC, ou seja, a complacência é responsável pela dinâmica intracraniana. Quando a complacência é adequada, um aumento no

volume do tecido cerebral, de sangue ou de líquor não produz aumento na PIC, porém, quando a complacência é diminuída, qualquer aumento, ainda que mínimo no volume dos componentes intracranianos pode alterar a PIC[3]. Portanto, a monitoração da PIC é importante, pois é uma ferramenta capaz de retratar o estado de complacência cerebral[4].

O aumento da PIC apresenta alta taxa de morbimortalidade, portanto, se a PIC não for rapidamente controlada a evolução para morte encefálica é inevitável[5].

O ideal é que o registro da PIC se dê de forma contínua, pois assim, além da verificação de valores da PIC, pode-se também observar o aspecto morfológico do traçado, que também pode indicar anormalidades[6].

De modo convencional, a monitoração da PIC se dá de forma invasiva, através de inserção de cateteres dentro do crânio. Tais cateteres podem ser introduzidos em regiões de parênquima cerebral, ventrículos, espaço subaracnóideo, subdural ou extradural[7].

Apesar de ser bastante precisa, a avaliação de forma invasiva pode levar a complicações como: infecções intracranianas, hemorragias, obstrução do transdutor e perda do sinal[8].

Maneiras de monitorar a PIC de forma não invasiva vem sendo buscadas há muito tempo[9]. Pensando nisso, pesquisadores do Instituto de Estudos Avançados de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP) desenvolveram um método não invasivo para avaliação da PIC[7].

Com a utilização desse novo sistema, a avaliação da PIC se dá através de um instrumento não invasivo, constituído por um sensor que, colocado em uma das áreas parietais do crânio detecta as mais leves deformações que eventualmente ocorram no crânio dos pacientes, sem necessidade de perfuração. Esse sensor é conectado a um sistema de monitoramento que mede as oscilações, e os sinais, após serem amplificados e decodificados, geram gráficos que mostram a pressão intracraniana[2].

A PIC tem flutuações determinadas pelos ciclos respiratório e cardíaco, portanto, acredita-se que as doenças cardiovasculares possam desencadear alterações metabólicas que levam ao aumento da volemia ou a edema cerebral, e isto, consequentemente, pode acarretar em modificações na PIC[6,7].

As doenças cardiovasculares afetam grande parcela da população mundial e estão entre as principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento[10]. No Brasil, aproximadamente 30% dos óbitos, se dão por tais doenças[11]. Apesar dos avanços em relação ao tratamento clínico e farmacológico dessas doenças, muitas vezes é necessário à realização de intervenção cirúrgica[12].

A PIC pode ser um importante parâmetro a ser avaliado em pacientes com doença cardiovascular, bem como, em pacientes submetidos a cirurgias para o tratamento destas patologias, uma vez que a intervenção cirúrgica pode interferir na funcionalidade deste sistema, portanto, já que as flutuações da PIC são determinadas por parâmetros respiratórios e cardíacos acredita-se que a condição cardiovascular pode interferir na mesma[6].

O fluxo sanguíneo cerebral é altamente dependente da pressão arterial de gás carbônico ($PaCO_2$)[13]. Enquanto o oxigênio (O_2) promove vasoconstrição, o gás carbônico (CO_2) provoca vasodilatação cerebral, portanto qualquer situação que leve a uma queda da PaO_2 e consequente aumento da $PaCO_2$ provoca vasodilatação progressiva, podendo ocorrer um aumento no fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e no volume sanguíneo cerebral (VSC) e, consequentemente, aumento da PIC[14].

O aumento da FR induz a uma hiperventilação, que por sua vez, causa redução da $PaCO_2$, acarretando em vasoconstrição arterial. Concomitante a isso, ocorre redução FSC e do VSC, o que leva a diminuição da PIC[13]. A hiperventilação otimizada, por curto período, é um dos tratamentos utilizados em pacientes com PIC elevada[8,14]. Portanto, a função respiratória também exerce influência na fisiologia cerebral[13].

O objetivo deste trabalho é monitorar a PIC de pacientes no pré e pós-operatórios de cirurgias cardíacas e identificar possíveis relações da PIC com a função cardiovascular.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo prospectivo, experimental e comparativo, realizado através de pesquisa aplicada. O estudo foi realizado no Hospital Bom Jesus, referência em cirurgia cardíaca na região dos Campos Gerais.

A amostra de conveniência constituiu-se de 54 pacientes que foram submetidos à cirurgia cardíaca na cidade de Ponta Grossa no ano de 2017. Para a convocação da amostra, foi realizada busca ativa juntamente aos pacientes internados no período pré-operatório.

Incluíram-se na pesquisa, pacientes pré- e pós- cirurgia cardíaca, de ambos os sexos, entre 40 e 80 anos.

Foram excluídos pacientes cardíacos instáveis; pacientes submetidos a cirurgias de emergência, não possibilitando a avaliação inicial; intercorrências durante o período de avaliação, impossibilidade da realização da avaliação final e pacientes incapazes de compreender as intervenções a serem realizadas.

Foram excluídos dois pacientes que evoluíram com óbito durante a cirurgia (1) e antes da extubação (1).

Antes da realização do trabalho, todos os indivíduos receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) e seus familiares também foram informados sobre a pesquisa. Previamente ao início do projeto, todos os procedimentos utilizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), vinculada a Plataforma Brasil (Parecer N. 1.752.829).

Ao iniciar o estudo, foram coletadas informações relacionadas a dados pessoais, anamnese e exame físico dos participantes. A anamnese foi composta por queixa principal, história da moléstia atual (HMA), história da moléstia pregressa (HMP), medicamentos e

hábitos de vida.

Em até no máximo 24 horas antes da realização da cirurgia, foi realizada avaliação da PIC. O sensor foi colocado em uma das áreas parietais do crânio do paciente (sem necessidade de perfuração nem tricotomia) [2].

As ondas e pulsos de PIC ao atingir o crânio causam expansões e retrações em seu volume, e tal sensor é capaz de detectar as mais leves deformações que eventualmente ocorram no crânio dos pacientes [2, 15]. O sensor é conectado a um sistema de monitoramento que mede as oscilações, e os sinais, após serem amplificados e decodificados, geram gráficos que mostram a pressão intracraniana [2].

Através de um programa especialmente desenvolvido para a interpretação desses sinais, os gráficos podem ser convertidos em valores numéricos, nos dando o valor da relação entre os picos obtidos pelos traçados [15].

O traçado da onda da PIC apresenta morfologia modificada da pulsação arterial e consiste em três picos. O primeiro pico (P1) resulta da transmissão do pulso de onda arterial para o plexo coroide. O segundo pico (P2) varia a partir da complacência cerebral. O terceiro pico (P3) está relacionado com o fechamento cardíaco da válvula aórtica. Cérebros complacentes possuem picos P1, P2 e P3 de forma decrescente, enquanto cérebros com complacência inadequada apresentam picos P2 aumentados em relação ao P1 e P3, ou seja, quando a PIC está normalizada, P1 é maior que P2 e P2 é maior que P3, mas, conforme ocorre o aumento da PIC, a relação de P2 sobre P1 apresenta-se aumentada e a amplitude de P2 tende a ultrapassar a de P1 [4, 15]. A amplitude de pulso é a diferença entre a PIC máxima e a PIC mínima durante um ciclo cardíaco ou uma onda de PIC, e a PIC média pode ser obtida através da correlação linear entre pontos consecutivos[17].

A relação P2/P1 é definida pela razão entre a amplitude destes dois picos, ou seja: R= AmpP2 /AmpP1; O resultado obtido através dessa equação é considerado normal quando encontrado valores abaixo de 0,9; levemente alterados quando obtidos valores entre 0,9 e 1,0. Valores acima de 1,0 são considerados alterados[7].

A avaliação da PIC durou cerca de 5 minutos, e para definir a média das relações P2/P1, foram analisados 5 traçados (TPIC) de cada aferição; após, os valores obtidos foram somados e divididos pelo número de picos (TPIC 1+TPIC 2+ TPIC 3+ TPIC 4+ TPIC 5 = TPIC total. Após: TPIC total / 5).

Em no máximo 24 horas após a cirurgia (após a extubação, ou seja, retirada do tubo orotraqueal e da ventilação mecânica), a PIC foi reavaliada.

RESULTADOS

A tabela 1 nos mostra os dados obtidos em relação ao número de pacientes que apresentaram complacência cerebral normal, levemente alterada ou alterada de acordo com os valores encontrados através da R=P2/P1 e morfologias dos traçados de PIC no pré

e pós-operatório de cirurgia cardíaca.

AVALIÇÃO	NORMAL P2/P1 <0,9	LEVEMENTE ALTERADO P2/P1: 0,9-1,0	ALTERADO P2/P1 >1,0
MORFOLOGIA E P2/P1 –PRÉ –OPERATÓRIA	16	9	27
MORFOLOGIA E P2/P1 –PÓS -OPERATÓRIA	29	12	11

Tabela 1. Resultados relacionados à relação P2/P1 e morfologia do traçado de PIC no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca.

Levando tais dados em consideração, no presente estudo, pode-se observar que na avaliação pré-operatória 16 pacientes apresentaram valores da R=P2/P1 e morfologia do traçado de PIC dentro da normalidade, 9 pacientes apresentaram leve alteração, e 27 pacientes apresentaram valores e morfologias alterados. Já na monitoração pós-operatória, 29 pacientes apresentaram valores e morfologia dentro da normalidade, 12 levemente alterados e apenas 11 apresentaram valores e traçados alterados.

Dos 27 pacientes que no pré-operatório apresentaram morfologia alterada do traçado e valores de P2/P1 maiores que 1,0, indicando alteração da complacência cerebral, e consequentemente da PIC, 16 apresentaram melhora em relação à morfologia de traçados de PIC e da P2/P1 no pós- operatório, obtendo valores abaixo de 0,9; indicando normalidade.

A figura 1 mostra a morfologia dos traçados de PIC de um paciente no pré e no pós-operatório, sendo que na avaliação pré-operatória, observa-se que houve alteração na morfologia, uma vez que P2> P1, tendo obtido como resultado de P2/P1, o valor de 1,518519.

Já no pós-operatório, nota-se que houve normalização na morfologia do traçado, e o valor encontrado para P2/P1 foi de 0,808511, sugerindo melhora em relação à complacência cerebral e valor de PIC dentro da normalidade.

Apenas 11 pacientes permaneceram com alteração da morfologia de PIC, onde P2>P1, e com valores da relação P2/P1 maior que 1, fatores sugestivos de alteração de complacência cerebral e PIC.
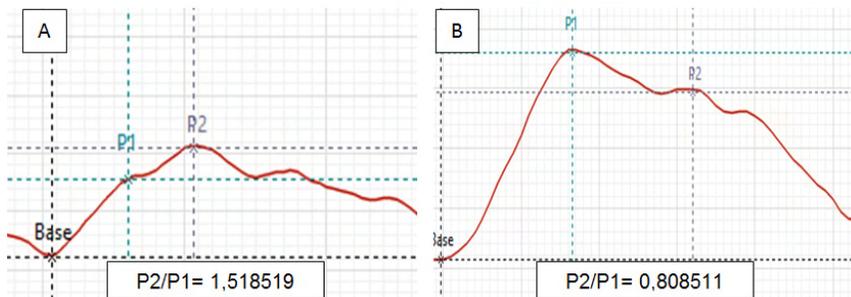
Figura 1. Comparação da morfologia do traçado de PIC e de P2/P1 de um mesmo paciente no pré (A) e pós- operatório (B) de cirurgia cardíaca.

Fonte: Os autores.

DISCUSSÃO

O estudo de Silva (2016) analisou de forma não invasiva a PIC de 10 pacientes com suspeita de síndrome coronariana aguda e/ou IAM, com o objetivo de investigar quanto ao risco cardiovascular e possíveis alterações na PIC; porém não observou alteração significativa na PIC em nenhum dos pacientes submetidos à monitoração. Entretanto, o autor enfatiza a necessidade de mais estudos que investiguem a relação de patologias cardíacas e outras diversas situações clínicas com possíveis alterações na PIC[7].

Diferentemente do estudo de Silva, o presente estudo nos mostra que houve diferença em relação aos valores da R=P2/P1 e a morfologia do traçado da PIC no pós-operatório quando comparado ao pré- operatório, sugerindo-nos que a condição cardiovascular pode interferir e alterar a PIC.

Infelizmente há escassez da literatura relacionando as doenças cardiovasculares com possíveis alterações da PIC e sua monitoração, porém, outros estudos têm verificado a PIC em diversas situações clínicas.

O estudo de Barbosa (2016) avaliou de forma não invasiva a PIC de pacientes com doença renal crônica, com o objetivo de monitorar a PIC desses pacientes antes e após a realização de hemodiálise e relacionar os resultados com o perfil clínico dos pacientes. Observou que pacientes com doença renal crônica têm maior risco de sofrerem alterações em sua PIC, quando comparados com indivíduos sem a doença, sugerindo que, a realização da terapia dialítica pode ser eficaz na normalização da PIC. Dados deste estudo, em relação a exames laboratoriais realizados também mostraram que pacientes com doença renal são mais suscetíveis a desenvolverem doenças cardiovasculares[18].

Ballestero (2016)utilizou o equipamento de monitoração não invasiva de PIC em crianças e adolescentes com hidrocefalia e observou que nesta populaçãoo sensor pode ser bem utilizado, pois consegue detectar oscilações que podem sugerir alterações da PIC que podem evoluir para hipertensão intracraniana[5].

Bolella e colaboradores (2017) utilizaram o método não invasivo para monitorar a PIC de um paciente com meningite criptocócica associada ao vírus da imunodeficiência (HIV-CM) e hipertensão intracraniana grave antes e após a punção lombar terapêutica. Observaram que houve diferenças em relação a P2/P1 e morfologia do traçado de PIC antes e após a punção lombar, com reversão das alterações encontradas na avaliação pré - punção quando comparadas a avaliação pós-punção. Com isso concluíram que o sensor de PIC não invasivo foi capaz de monitorar os pulsos de pressão intracraniana, mostrando mudanças morfológicas que eram consistentes com o estado clínico do paciente[15].

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se supor que alterações do sistema cardiovascular podem alterar a complacência cerebral e, consequentemente a PIC dos indivíduos acometidos.

Pode-se sugerir também, que a realização do tratamento de tais patologias através de cirurgia cardíaca é efetiva não só em relação à funcionalidade cardíaca e do sistema cardiovascular, mas também para o tratamento de desordens da PIC associadas às doenças cardiovasculares.

Portanto, torna-se importante a recomendação da aferição da PIC em pacientes cardiopatas, independente de indicação cirúrgica. Porém, nos pacientes submetidos a tais intervenções, à monitoração de tal sinal (PIC) é de grande valia, uma vez, que no pós-operatório, podem ocorrer alterações cardiovasculares que possam culminar em alterações na complacência cerebral e PIC, podendo sugerir complicações que podem ser prevenidas ou tratadas precocemente, se detectadas o mais breve possível, contribuindo para o aumento da sobrevida desta população.

REFERÊNCIAS

1 ENRIONE, M. A. **Current concepts in the acute management of severe pediatric head trauma.** Journal Clinical Pediatric Emergency Medicine, v. 2, p. 28-40, 2001.

2 MASCARENHAS, S.; VILELA, G. H. F.; CARLOTTI, C.; *et al*. T**he new ICP minimally invasive method shows that the Monro-Kellie doctrine is not valid**. Acta Neurochirurgica Supplementum, v. 114, p. 117-119, 2012.

3 RÉA NETO, A., MENDES, C.L.; REZENDE, E. A. C.; *et al.* **Monitorização em UTI.** Editora: Revinter (2004).

4 DI LEVA, A.; SCHMITZ, E. M.; CUSIMANO, M. D. **Analysis of Intracranial Pressure: Past, Present, and Future.** Journal The Neuroscientist, v.20, p.1–12, 2013.

5 BALLESTERO, M. F. M. **Avaliação de método não invasivo para monitoração da pressão intracraniana em crianças e adolescentes portadores de hidrocefalia.** Dissertação de mestrado em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016.

6 CARLOTTI JR, C.; BENEDICTO, O. C.; DIAS, L. A. A. **Hipertensão intracraniana.** Revista Medicina-Ribeirão Preto, v. 31, p. 552-562, 1998.

7 SILVA, A. J. M. **Estudo de risco cardiovascular: uma proposta do uso de mieloperoxidase** sérica e avaliação da pressão intracraniana. Dissertação de mestrado (PPGCF), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa-PR, 2016.

8 GIUGNO, K. M.; MAIA, T. R.; KUNRATH, C. L.; *et al.* **Tratamento da hipertensão intracraniana.** Jornal de Pediatria, v.79, p.287-296, 2003.

9 ZORZETTO, R. **Sensor permite monitorar de modo não invasivo alterações no cérebro causadas por traumas e pela gestação.** Revista de Pesquisa FAP ESP, v. 221, p. 19-23, 2014.

10 REDDY, K. S. **Cardiovascular diseases in the developing countries: dimensions, determinants, dynamics and directions for public health action.** Revista Health Nutrition, v. 5, p. 231-237, 2002.

11 SUS- PORTAL SAÚDE. **Entidades apoiam plano para reduzir mortes precoces.** 2011. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm/?portal=pagina.visualizarNoticia&codConteudo=2425&codModuloArea=162&chamada=entidades-apoiam-plano-para-reduzir-mortes-precoces . Acesso em: 12/06/2017.

12 TORRATI, F. G., DANTAS, R. A. S. **Circulação extracorpórea e complicações no período pós-operatório imediato de cirurgias cardíacas**. Acta Paulista de Enfermagem, v. 25, p. 340-345, 2012.

13 SILVA, C. H. R.; PEREIRA, S. M.; BROCHADO, V. M. **Ventilação mecânica em neurocirurgia.** Revista de Medicina de Minas Gerais, v. 24, p. 33-42, 2014.

14 ABREU, M. O.; ALMEIDA, M. L. **Manuseio da ventilação mecânica no trauma cranioencefálico: hiperventilação e pressão positiva expiratória final.** Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 21, p. 72-79, 2009.

15 BOLLELA, V. R.; FRIGIERI, G., VILAR, F. C.; *et al.* **Noninvasive intracranial pressure monitoring for HIV-associated cryptococcal meningitis**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.50, p. 1-5, 2017.

16 ADAMS, J. P.; BELL, D.; MCKINLAY, J. **Neurocritical care: a guide to practical management.** Editora: Springer Science & Business Media. Londres, 2010.

17 KIM, D. J.; CZOSNYKA, Z.; KEONG, N.; *et al.* **Index of cerebrospinal compensatory reserve in hydrocephalus.** Journal Neurosurgery Baltimore, v. 64, p.494-502, 2009.

18 BARBOSA, C. R. **Avaliação laboratorial e monitoração não invasiva da pressão intracraniana em pacientes submetidos à hemodiálise.** Dissertação de mestrado (PPGCF), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa-PR, 2016.

SOBRE A ORGANIZADORA

CLAUDIANE AYRES - Possui graduação em Fisioterapia pelo Centro de Ensino Superior de Campos Gerais (2012). Recebeu diploma de mérito acadêmico, conquistando o primeiro lugar geral da turma de formandos 2012, do curso de Fisioterapia do Centro Superior do Campos Gerais- CESCAGE. Mestre em Ciências Biomédicas - UEPG (2016-2018) Pós-graduada em Fisioterapia Dermatofuncional CESCAGE (2012-2013). Pós-graduada em Gerontologia- UEPG (2017-2018); Pós-graduada em Fisioterapia Cardiovascular (2017-2018); Tem experiência nas áreas de fisioterapia em de Fisioterapia em UTI (Geral, coronariana e neonatal); Fisioterapia Hospitalar, Fisioterapia em DTM e orofacial; Fisioterapia em Saúde do Idoso; Atuou como docente do curso técnico em estética do CESCAGE-2013; Atuou na área de fisioterapia hospitalar e intensivismo (UTI Geral e coronariana)- 2016- 2018; Atualmente, atua como docente em cursos profissionalizantes de estética facial, corporal e massoterapia na Idealle Cursos; Atua também como docente do curso de Fisioterapia do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais - CESCAGE. Atua ainda como docente do curso Tecnólogo em Estética e Cosmetolgoia - UNICESUMAR.

ÍNDICE REMISSIVO

A

B

C

D

E

H

L

M

O

P

R

S

T

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

Ano 2022

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

Ano 2022